



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza
Instituto de Química

Projeto Final de Curso
IQWX01

Dinâmica conformacional dos domínios amino-terminais RRM1-2 do regulador pós-transcricional HuR

Kleber Avila Jendiroba

Rio de Janeiro
Dezembro/2016

DINÂMICA CONFORMACIONAL DOS DOMÍNIOS RRM1-2 DO REGULADOR PÓS-TRANSCRICIONAL HuR

Kleber Avila Jendiroba

PROJETO DE FINAL DE CURSO SUBMETIDO AO CORPO DOCENTE DO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE QUÍMICO COM ATRIBUIÇÕES TECNOLÓGICAS.

Prof. Anderson de Sá Pinheiro (IQ-UFRJ)

Prof^a. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (ICB-UFMG)

Prof. Bruno Araujo Cautiero Horta (IQ-UFRJ)

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
DEZEMBRO/2016

Jendiroba, Kleber Avila.
DINÂMICA CONFORMACIONAL DOS DOMÍNIOS RRM1-2 DO
REGULADOR PÓS-TRANSCRICIONAL HuR /Kleber Avila Jendiroba
– Rio de Janeiro: UFRJ/IQ.

Dissertação (Projeto Final de Curso) – Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Centro de Ciências da Matemática e da Natureza,
Instituto de Química / DBQ, 2016.
Orientador: Anderson de Sá Pinheiro

1. HuR. 2. RRM1-2. 3. Pós-transcricional. 4. Ressonância Magnética
Nuclear. 5. Dinâmica. I. Pinheiro, Anderson de Sá II. Universidade
Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química.

Aos meus pais Mônica Ribeiro Ávila Jendiroba e Luis Anderson Jendiroba

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Mônica Ribeiro Avila Jendiroba e Luis Anderson Jendiroba, e minha irmã, Kamilla Avila Jendiroba, por servirem de base emocional, me dando todos os tipos de conselhos possíveis e imaginários, e me ajudando nos momentos difíceis pelos quais passei. Agradeço, também, por terem me fornecido meios que me permitiram alcançar os objetivos que eu almejei até hoje.

Agradeço aos meus outros familiares, em especial, à minha madrinha Margarete e meu padrinho Lucélio, por estarem sempre por perto e dispostos a me apoiar em quase todas as minhas decisões.

Agradeço aos amigos do IQ, por me suportarem em todos as aulas, e por me fazerem uma pessoa mais comunicativa. Aos professores, que me fizeram perceber o quanto a química é fantástica, e por me ouvirem nos meus momentos de desespero.

Em especial, quero agradecer aos meus amigos: Mari, Camilla, Thaissa, Rabelo, Roger, Rodolfo, Paula, Ju, Priori, Fernanda e Ana Luiza por terem me ouvido em todos os meus momentos de devaneio e loucura, dando suas broncas, conselhos, tapas, beijos e socos, sempre que eu começava e terminava de reclamar de algo. Vocês fizeram e fazem meus dias valerem a pena. Eu amo todos vocês e vou colocá-los no meu potinho!!

Agradeço às professoras Elis Eleuthério e Lúcia Paiva, e ao professor Reginaldo de Menezes por terem me apresentado à bioquímica, e ter despertado em mim o interesse pela área.

Agradeço aos meus colegas do LaBEP, Gui, Rafa, Bia, Leo, Bruno, DJ Louis, Gabi, Dudu, Diogo, Carol loira, Pamella e Carolixa por terem feito os meus dias mais alegres, e ter feito de mim uma pessoa mais venenosa.

Agradeço, principalmente, à Carolixa, que, em um dia no corredor, me sugeriu sutilmente ir ao laboratório conhecer o trabalho. A partir desse dia, minha vida foi totalmente diferente, tantas correrias, tantas vezes trabalhando até tarde, mas tantos risos juntos, tantos abraços, tantos esporros. Obrigado Carol, por ter sido meu porto seguro no laboratório, e por aguentar todos os meus abraços carentes, além dos milhões de conselhos, ajuda durante o período de aula, e por ser quem você é comigo.

Agradeço às professoras Dani e Cris por estarem sempre dispostas e me ajudarem durante a minha rotina, dando dicas, conselhos, e pelas festas de crianças onde eu pude comer como se não houvesse amanhã.

Agradeço ao professor Anderson Pinheiro, que é meu orientador, por toda paciência, puxões de orelha, pelas explicações demoradas, pelos dias de RMN. Obrigado por tudo mesmo, sem você eu não tinha chegado aonde cheguei, nem saber tudo o que sei.

Agradeço também aos professores Bruno Horta e Mariana Quezado por terem aceitado participar da minha banca examinadora, respondendo de prontamente meu convite. Em especial, agradeço à professora Mariana pela colaboração no trabalho, adquirindo os dados IM-SM. Sem você meu trabalho não teria o desfecho que teve. Muito obrigado!

RESUMO

PROJETO DE CURSO – IQWX01

TÍTULO: DINÂMICA CONFORMACIONAL DOS DOMÍNIOS RRM1-2 DO REGULADOR PÓS-TRANSCRICIONAL HuR

ALUNO: Kleber Avila Jendiroba

ORIENTADOR: Anderson de Sá Pinheiro, DBQ – Instituto de Química – UFRJ

O antígeno humano R (HuR) atua como regulador pós-transcricional da expressão gênica através da sua atividade estabilizadora de RNA mensageiro. HuR é composta por três domínios funcionalmente distintos denominados motivos de reconhecimento de RNA (RRM, do inglês “*RNA Recognition Motif*”). Os domínios amino-terminais RRM1 e RRM2, dispostos em *tandem*, são responsáveis pela interação da proteína com sequências ricas em adenina e uracila presentes na região 3’ não-traduzida do mRNA. O presente trabalho teve como objetivo a caracterização dinâmica do domínio RRM1-2 de HuR por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e mobilidade iônica acoplada à espectrometria de massa (IM-MS), buscando esclarecer o mecanismo pelo qual HuR reconhece de maneira específica seus alvos de RNA. Com base do RMN multimensional em alta resolução, foi possível assinalar 98% das ressonâncias de RRM1-2₁₋₁₈₉, com exceção dos resíduos Met1, Ile152, Ile179 e os artefatos de clonagem N- e C-terminais. Durante o processo, foi observado a presença de ressonâncias extras no espectro de [¹H, ¹⁵N] HSQC, sugerindo, pelo menos, uma segunda conformação minoritária em solução. O fato dos deslocamentos químicos do RRM1 tanto isolado quanto no *tandem* RRM1-2 se mostrar semelhante, sugere ausência de contatos entre os domínios N-terminais. A região N-terminal que é intrinsecamente desordenada e o “linker” entre os domínios são altamente flexíveis, como demonstram os resultados de dinâmica. Além disso, as alças L3 (RRM1), L3’ e L5’ (RRM2) experimentam dinâmica térmica. O valor de τ_c estimado para RRM1-2₁₋₁₈₉ comparado a de uma proteína globular de massa molecular similar sugere um comportamento dos domínios RRM1 e RRM2 como módulos independentes em solução. O *tandem* RRM1-2₁₋₁₈₉ não experimenta troca conformacional em regime intermediário, como indicam os dados de dispersão de relaxação. Porém, foi observado que determinados resíduos apresentam, nas frequências intermediárias, um aumento de R_2^{eff} , sugerindo um regime de troca mais lento. Os dados de ESI-IM-MS sugerem que RRM1-2₁₋₁₈₉ na forma livre apresenta três conformações co-populadas. Esses resultados sugerem que a dinâmica na interação da HuR com seus substratos de RNA segue um mecanismo de seleção conformacional.

Sumário

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Índice de Figuras.....	x
Índice de Abreviaturas.....	xii
Índice de Tabelas.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1 Regulação pós-transcricional da expressão gênica.....	1
1.2 Elementos ricos em adenina e uracila.....	2
1.3 Proteínas ligantes de mRNA.....	3
1.4 Antígeno humano R.....	5
2. Objetivo.....	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3. Material e métodos.....	11
3.1 Material.....	11
3.1.1 Meio Luria-Bertani (LB)	11
3.1.2 Meio mínimo (M9).....	11
3.1.3 Cepas bacterianas.....	11
3.2 Métodos.....	12
3.2.1 Clonagem dos domínios RRM1-2 da HuR.....	12
3.2.2 Transformação bacteriana.....	13
3.2.3 Expressão de RRM1-2 ₁₋₁₈₉	13

3.2.4	Eletoforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS PAGE).....	14
3.2.5	Purificação de RRM1-2 ₁₋₁₈₉	15
3.2.6	Dosagem de proteínas.....	16
3.2.7	Análise por espectrometria de massa (MS).....	16
3.2.8	Aquisição dos dados de RMN.....	17
3.2.9	Assinalamento sequencial das ressonâncias.....	17
3.2.10	Medida dos parâmetros de relaxação.....	18
3.2.11	Análise dos dados de relaxação.....	18
3.2.12	Análise por dispersão de relaxação.....	20
3.2.13	Análise conformacional por mobilidade iônica (IM) acoplada à espectrometria de massas.....	21
4.	Resultados.....	22
4.1	Purificação de RRM1-2 ₁₋₁₈₉	22
4.2	Assinalamento sequencial das ressonâncias de RRM1-2 ₁₋₁₈₉	27
4.2.1	¹ H 1D RMN.....	27
4.2.2	[¹ H, ¹⁵ N] HSQC.....	28
4.2.3	Estratégia de assinalamento das ressonâncias.....	30
4.2.4	Comparação com o assinalamento de RRM1 ₁₋₉₉	36
4.2.5	Caracterização dinâmica de RRM1-2 ₁₋₁₈₉	39
4.2.6	Caracterização do equilíbrio conformacional de RRM1-2 ₁₋₁₈₉	46
5.	Conclusão.....	50
6.	Referências bibliográficas.....	52

Índice de Figuras

Figura 1: RBPs definem o destino do mRNA na célula.....	4
Figura 2: Representação esquemática da organização dos domínios de HuR.....	7
Figura 3: Estrutura cristalográfica dos domínios amino-terminais RRM1-2 de HuR na ausência e presença de RNA.....	8
Figura 4: Representação esquemática da construção His ₆ -RRM1-2 ₁₋₁₈₉	12
Figura 5: Purificação de His ₆ -RRM1-2 ₁₋₁₈₉ por cromatografia de afinidade a níquel.....	23
Figura 6: Clivagem de His ₆ -RRM1-2 ₁₋₁₈₉ com a protease TEV.....	24
Figura 7: Purificação de RRM1-2 ₁₋₁₈₉ por cromatografia de troca aniônica.....	25
Figura 8: Purificação de RRM1-2 ₁₋₁₈₉ por cromatografia de gel-filtração.....	26
Figura 9: Análise da pureza de RRM1-2 ₁₋₁₈₉ por MALDI-TOF MS.....	27
Figura 10: Espectro 1D ¹ H de RRM1-2 ₁₋₁₈₉	28
Figura 11: Espectro 2D [¹ H, ¹⁵ N] HSQC de RRM1-2 ₁₋₁₈₉	29
Figura 12: Representação esquemática de experimentos de RMN de dupla e tripla ressonância.....	32
Figura 13: Representação esquemática dos espectros de tripla ressonância HNCACB e CBCA(CO)NH.....	33
Figura 14: Valores dos deslocamentos químicos de ¹³ C dos 20 aminoácidos comumente encontrados em proteínas em conformação randômica.....	34
Figura 15: Fatias dos espectros CBCA(CO)NH e HNCACB coletados para RRM1-2 ₁₋₁₈₉	35
Figura 16: Espectro 2D [¹ H, ¹⁵ N] HSQC de RRM1-2 ₁₋₁₈₉ assinalado.....	37
Figura 17: Comparação dos deslocamentos químicos de RRM1-2 ₁₋₁₈₉ em <i>tandem</i> e RRM1 ₁₋₉₉ isolado.....	38
Figura 18: Parâmetros de relaxação do núcleo de ¹⁵ N medidos para RRM1-2 ₁₋₁₈₉	40

Figura 19: Resumo da dinâmica térmica (ps-ns) de RRM1-2 ₁₋₁₈₉	41
Figura 20: Dinâmica intermediária (μs-ms) de RRM1-2 ₁₋₁₈₉	44
Figura 21: Curvas de DR CPMG para determinados resíduos de RRM1-2 ₁₋₁₈₉	45
Figura 22: Análise de RRM1-2 ₁₋₁₈₉ por ESI-IM-MS.....	47

Índice de Abreviaturas

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
Abs	Absorbância
Abs600nm	Absorbância a 600 nm
APS	Persulfato de amônio, do inglês <i>ammonium persulfate</i>
ARE	Elemento rico em adenina e uracila, do inglês <i>adenine and uracil-rich element</i>
C-terminal	Carboxi terminal
CPE	Elemento de poliadenilação citoplasmática, do inglês <i>cytoplasmatic poliadenilation element</i>
D.O	Densidade Óptica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dsRBD	Domínio de ligação a dupla-fita de RNA, do inglês <i>double stranded RNA binding domain</i>
DSS	Ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico, do inglês <i>4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid</i>
DTT	Ditiotreitol
ELAV	<i>Embryonic Lethal Abnormal Visual</i>
ESI	Ionização por eletrospray, do inglês <i>electron spray ionization</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
HSQC	Coerência heteronuclear de simples-quantum, do inglês, <i>Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Lúria-Bertani, meio rico para cultivo de micro-organismos
MALDI	Dessorção/ionização de matriz assistida por laser, do inglês <i>Matrix assisted laser desorption/ionization</i>
N-terminal	Amino-terminal
NOE	Efeito Overhauser nuclear, do inglês <i>Nuclear overhauser effect</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RBP	Proteína ligante de RNA, do inglês <i>RNA binding protein</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNP	Ribonucleoproteínas
RRM	Domínio de reconhecimento de RNA, do inglês <i>RNA Recognition Motif</i>
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEC	Elemento de controle translacional, do inglês <i>translational control element</i>
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TOF	Tempo de vôo, do inglês <i>time of flight</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TWIMS	<i>Traveling wave ion mobility spectrometry</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>

Índice de Tabelas

Tabela 1: Materiais utilizados na preparação dos géis para SDS PAGE.....	14
Tabela 2: Descrição dos experimentos de RMN utilizados para o assinalamento das ressonâncias da cadeia principal de proteínas.....	31

1. Introdução

1.1. Regulação pós-transcricional da expressão gênica

Os eucariotos empregam diversos mecanismos para controlar precisamente a expressão gênica, a fim de garantir o aproveitamento ideal da energia disponível na célula (MOORE, 2005). A regulação pós-transcricional da expressão gênica, ou seja, aquela que ocorre após o evento da transcrição, refere-se ao conjunto de mecanismos que atuam sobre o mRNA, regulando os seus níveis, e, conseqüentemente, a taxa de síntese proteica. Tais mecanismos atuam sobre diversos processos celulares, como processamento, transporte, localização, estabilização e degradação do mRNA (MIGNONE et al. 2002; DASSI & QUATRONE et al. 2012). Dentre estes, o controle da taxa de degradação do mRNA desempenha papel de destaque (BEVILACQUA et al. 2003)

A regulação pós-transcricional da expressão gênica se inicia no núcleo com a adição de um resíduo de 7-metilguanosina à terminação 5' (*cap-5'*), adição de uma cauda de poliadeninas (poliA) à terminação 3', *splicing* e edição do pré-mRNA. Essas modificações determinam a eficiência dos processos de transporte e tradução, além de serem cruciais para a manutenção da estabilidade dos transcritos (MOORE, 2005; DASSI & QUATRONE et al. 2012). Os mRNAs eucarióticos possuem, além de suas sequências codificantes, regiões regulatórias não-codificantes presentes nas terminações 5' e 3' (UTRs – *untranslated regions*). O controle pós-transcricional destes mRNAs é desempenhado por UTRs conservadas, os chamados elementos regulatórios de sequência não-codificantes (USERS – *untranslated sequence elements for regulation*) ou, simplesmente, elementos *cis*-regulatórios (MIGNONE et al. 2002). Estas sequências específicas presentes nas UTRs são reconhecidas por um repertório de fatores *trans*-regulatórios, incluindo proteínas que se ligam ao mRNA (RBPs – *RNA-binding proteins*), que regulam o destino do mRNA na célula (GLISOVIC et al. 2008; CASTELLO et al. 2012). A interação entre elementos regulatórios *cis* e *trans* pode resultar na degradação, estabilização, ou sequestro do mRNA, modulando assim a taxa de tradução (BEVILACQUA et al. 2003).

1.2. Elementos ricos em adenina e uracila

Os mRNAs eucarióticos apresentam um ou mais elementos *cis*-regulatórios em suas sequências, o que permite que seu produto final seja encontrado em diferentes localizações subcelulares e seja expresso em diferentes momentos do ciclo de vida das células (MOORE et al. 2005). Alguns desses elementos regulatórios contêm motivos de sequência bem caracterizados, tais como: ARE (*adenine and uracil-rich element*), CPE (*cytoplasmic polyadenylation element*), TER (*translational control element*), TOP (*terminal oligo-pirimidine*) e BRUNO (AMALDI & PIERANDREI-AMALDI, 1997; DAHANUKAR & WHARTON, 1996; KIM-HA et al., 1995; MENDEZ & RICHTER, 2001; SHAW & KAMEN, 1986)

Os AREs são os elementos *cis*-regulatórios mais estudados, sendo observados principalmente nas regiões 3'-UTR de mais de 4000 mRNAs (BARREAU et al. 2006). Eles estão normalmente associados à degradação do mRNA. Entretanto, isso é dependente da sequência do transcrito, de forma que a presença de AREs em mRNAs diferentes pode levar a efeitos distintos (CHEN & SHYU, 1995).

Os AREs foram inicialmente identificados em mRNAs lábeis que codificam proteínas como citocinas (GILLIS & MALTER, 1991), fatores de crescimento (LEVY et al. 1996), proto-oncogenes (RAYMOND et al. 1989), proteínas reguladoras do ciclo celular, mediadores da inflamação e ativadores transcricionais (CAPUT et al., 1986; GILLIS & MALTER, 1991; CHEN et al., 1994). O tamanho dos AREs é variado, assim como a quantidade de adeninas e uracilas. Apesar da ausência de um domínio conservado, os AREs podem ser divididos em 3 grandes classes com base no número e na distribuição do pentâmero AUUUA (CHEN et al. 1994; CHEN & SHYU, 1995). Os AREs pertencentes à classe I contêm várias cópias subsequentes do motivo pentamérico AUUUA. Os AREs da classe II apresentam alguns motivos AUUUA intercalados com sequências ricas em uracila. Os AREs da classe III não possuem motivos AUUUA e se caracterizam pela presença de regiões ricas em uracila (BARREAU et al. 2006).

1.3. Proteínas ligantes de mRNA

Em procariotos, a transcrição e a tradução são processos acoplados fisicamente. Em eucariotos, no entanto, estes ocorrem em compartimentos separados, núcleo e citoplasma, respectivamente. Esse fato permite que os eucariotos realizem um extenso processamento pós-transcricional do pré-mRNA, que irá produzir uma variedade de mRNAs a partir do genoma, além de fornecer uma etapa adicional de regulação da expressão gênica (MOORE, 2005). As reações de processamento do mRNA, incluindo o *splicing*, edição e poliadenilação, são iniciadas logo que o pré-mRNA emerge de seus locais de transcrição. Essas reações são mediadas por complexos formados por proteínas ligantes de mRNA (RBPs) e RNAs de ação *trans*, denominados de ribonucleoproteínas (RNPs). Portanto, as RBPs desempenham diversas funções na biologia do mRNA, como *splicing* alternativo, edição do pré-mRNA, exportação, localização subcelular, *turnover* e tradução (GLISOVIC et al. 2008; CASTELLO et al. 2012).

Embora todas as RBPs se liguem a RNA, essa interação ocorre com diferentes afinidades e especificidades (BALTZ et al. 2012). Essa atividade é mediada por um número relativamente pequeno de ligantes de RNA, cujas propriedades são, adicionalmente, moduladas por domínios auxiliares. Esses domínios podem também mediar interações das RBPs com outras proteínas e, em alguns casos, estão sujeitos à regulação por modificação pós-traducional. Em vista disso, as células estão capacitadas a gerar inúmeras RNPs de composição e arranjos únicos para cada substrato de mRNA (LUNDE et al. 2007). Elas, ainda, podem ser remodeladas durante o curso de maturação do mRNA até a sua forma funcional. As RBPs contêm frequentemente um ou vários domínios ligantes de RNA. Alguns desses domínios são bem caracterizados, por exemplo: domínio dedo de zinco (*ZnF – zinc finger motif*) (KLUG, 2010), domínio de ligação a dupla-fita de RNA (*dsRBD – double stranded RNA binding domain*) (DOYLE & JANTSCH, 2002) e domínio de reconhecimento de RNA (*RRM – RNA recognition motif*) (CLÉRY et al. 2008), sendo este o mais comum entre as RBPs.

O genoma humano codifica mais de 800 RBPs diferentes (BALTZ et al. 2012; CASTELLO et al. 2012). A maioria delas, como AUF-1, TTP e KSRP, sinalizam para a desestabilização e consequente degradação do mRNA (XIAO & WANG, 2011). Outras, como TIA-1 e TIAR, estão envolvidas no silenciamento da tradução através do sequestro do mRNA para grânulos de estresse (BUCHAN & PARKER, 2009). As únicas RBPs capazes de estabilizar os transcritos de mRNA e exercer efeitos positivos sobre a taxa de síntese proteica são aquelas pertencentes à família ELAV/Hu (*Embryonic Lethal Abnormal Vision/Human antigen proteins*), especificamente o antígeno humano R (SRIKANTAN & GOROSPE, 2012) (Figura 1).

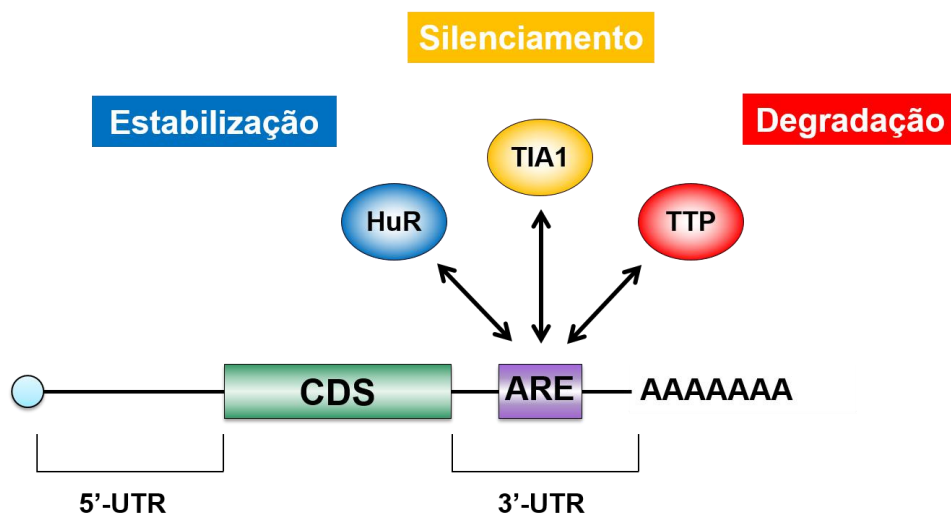


Figura 1: RBPs definem o destino do mRNA na célula. Representação esquemática do mRNA eucariótico maduro, evidenciando as regiões não-traduzidas (5'-UTR e 3'-UTR). Em verde, a sequência codificante do mRNA. As regiões 3'-UTR, em geral, contêm os elementos ricos em adenina e uracila (AREs), que precedem a cauda poliA do mRNA. Os AREs são reconhecidos por uma gama de RBPs diferentes. A interação RBP-ARE define o destino do mRNA nas células. Dependendo da natureza da RBP, a interação da mesma com os AREs pode levar a três processos distintos: degradação, silenciamento e estabilização do mRNA.

1.4. Antígeno humano R

O antígeno humano R (HuR) é uma proteína pertencente à família ELAV/Hu de RBPs humanas. Esta família foi primeiramente descrita através da similaridade de sequência com a proteína ELAV de *Drosophila melanogaster*, envolvida no desenvolvimento do sistema nervoso central desse inseto. Em 1996, o ortólogo humano de ELAV foi clonado e caracterizado (MA et al., 1996). O gene *ELAVL1*, localizado na região cromossômica 19p13.2, codifica uma proteína de 326 aminoácidos denominada de antígeno humano R (MA & FURNEAUX, 1997).

Dentre os membros da família ELAV/Hu, HuR, também conhecida como HuA, é o único cuja expressão se dá de forma ubíqua. As demais proteínas pertencentes a esta família apresentam um padrão de expressão tecido-específica. A HuB é encontrada em neurônios e gônadas, enquanto a expressão de HuC e HuD está restrita a neurônios (DESCHÊNES-FURRY et al. 2006). A HuR é uma proteína de localização predominantemente nuclear. Entretanto, ela sofre translocação para o citoplasma em resposta a estímulos específicos, como os proliferativos e de estresse. No núcleo, HuR participa da regulação dos eventos de *splicing* e poliadenilação do pré-mRNA (DOLLER et al., 2008). No citoplasma, ela se liga a uma gama de transcritos de mRNA através da interação com os ARES presentes principalmente nas suas regiões 3'-UTRs. A interação de HuR com ARES geralmente leva a estabilização dos transcritos, podendo estar acompanhada ou não do aumento da tradução (HINMAN & LOU, 2008).

Dentre os mRNAs alvos de HuR, muitos codificam proteínas que participam de processos essenciais para a formação e desenvolvimento de tumores, como citocinas, fatores de crescimento, supressores tumorais, proto-oncogenes, proteínas reguladoras do ciclo celular, de apoptose e enzimas inflamatórias (DE SILANES et al. 2005). Em consonância com sua função estabilizadora de mRNA, altos níveis de HuR foram encontrados no citoplasma de células de diversos tipos de carcinoma e mesotelioma (BLAXALL et al. 2000; DENKERT et al. 2004a; DENKERT et al. 2004b; DE SILANES et al. 2003). Dados clínicos mostram que

a superexpressão citoplasmática de HuR está relacionada com características clínico-patológicas específicas do tumor (tamanho e resistência a drogas), bem como com a baixa sobrevida de pacientes (DENKERT et al. 2004a; DENKERT et al. 2004b). Neste contexto, HuR surge como um potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de novas drogas anti-câncer. A inibição de HuR através do composto MS-444, uma pequena molécula inibidora de HuR, em células de carcinoma colorretal promoveu a diminuição do crescimento e aumento de apoptose nessas células, confirmando a utilização de HuR como uma estratégia terapêutica efetiva contra o câncer (BLANCO et al., 2016).

A HuR possui cerca de 36 kDa e apresenta uma arquitetura tripartida formada por três domínios funcionalmente distintos (**Figura 2**). Esses domínios, conhecidos como RRM (do inglês *RNA recognition motif*), constituem motivos estruturais de reconhecimento de RNA e contribuem individualmente para a interação da proteína com seus substratos de mRNA. Os domínios amino-terminais RRM1 e RRM2 estão dispostos em *tandem* e são responsáveis pelo reconhecimento dos AREs, levando à estabilização dos transcritos e modulação da tradução (DE SILANES et al. 2004; HINMANN & LOU, 2008). Já o domínio carboxi-terminal RRM3 contribui para a interação com a cauda poliA do mRNA e com outros ligantes de natureza proteica (BRENNAN et al. 2000). Além disso, esse domínio apresenta uma atividade 3' adenosiltransferásica capaz de promover o alongamento da cauda poliA (MEISNER et al. 2009) (**Figura 2**). Portanto, HuR é capaz não somente de reconhecer e se ligar, mas também de modificar a sequência dos seus substratos de mRNA.

Os domínios amino-terminais RRM1-2 e o domínio carboxi-terminal RRM3 estão conectados através de uma sequência específica conhecida como HNS (*HuR nucleocytoplasmic shuttling*). Esta sequência é responsável pela translocação de HuR entre o núcleo e o citoplasma, de forma a estabilizar e aumentar a eficiência da tradução dos seus mRNAs (FAN & STEITZ. 1998a; FAN & STEITZ, 1998b) (**Figura 2**).

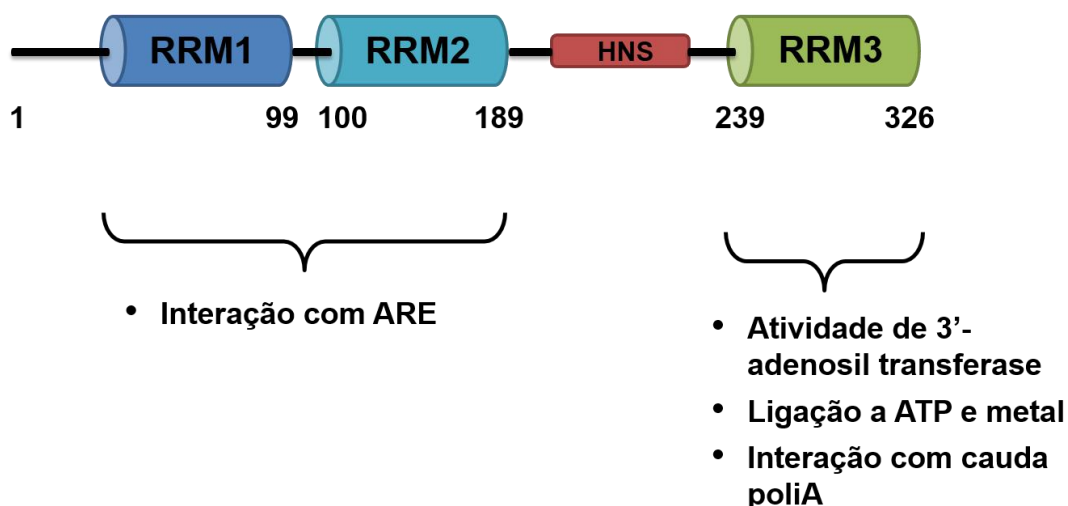


Figura 2: Representação esquemática da organização em domínios de HuR. HuR (aminoácidos 1–326) é formada por três domínios RRM (*RNA recognition motif*) funcionalmente distintos. Na figura, o domínio RRM1 (resíduos 1–99) está mostrado em azul, o domínio RRM2 (resíduos 100–189) está mostrado em ciano, enquanto o domínio RRM3 (resíduos 239–326) está evidenciado em verde. Os domínios amino-terminais RRM1-2 estão dispostos em *tandem* e são responsáveis pela interação de HuR com os AREs presentes na região 3'-UTR do mRNA. O domínio carboxi-terminal RRM3 apresenta uma atividade 3'-adenosil transferásica, suportada pela sua capacidade de interação com metal divalente, ATP e a cauda poliA do substrato de mRNA. Os domínios N- e C-terminais estão unidos por uma sequência chamada HNS (vermelho), responsável pelo tráfego da proteína entre o núcleo e o citoplasma das células.

A homodimerização tem sido descrita como um mecanismo necessário para que as proteínas da família Hu/ELAV desempenhem suas funções fisiológicas (MEISNER et al. 2007). Interessantemente, os membros HuB, HuC e HuD homodimerizam via o domínio carboxi-terminal RRM3. Recentemente, foi mostrado que o domínio RRM3 de HuR é capaz de formar dímeros em solução (DÍAZ-QUINTANA et al., 2015). Contudo, a contribuição dos demais domínios para o processo de homodimerização de HuR ainda permanece desconhecida.

A estrutura cristalográfica de HuR RRM1-2 mostra que esses domínios apresentam um enovelamento canônico, característico de domínios RRM, conhecido como sanduíche $\alpha\beta$, cuja topologia é $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$ (WANG et al., 2013) (**Figura 3**). Diferentemente de outros domínios RRM em *tandem*, a estrutura cristalográfica de HuR RRM1-2 revela que, na ausência de ligante, a proteína adota uma conformação aberta, com ausência completa de

contatos entre os domínios. Contudo, na presença de RNA, a proteína adota uma conformação fechada, onde os dois domínios se aproximam formando uma fenda positivamente carregada responsável pela ligação ao mRNA (WANG et al. 2013) (**Figura 3**). A partir da comparação destas estruturas, WANG et al. (2013) postularam que HuR interage com seus substratos de mRNA por meio de um mecanismo de ajuste induzido. Neste modelo, HuR, na sua conformação aberta, se liga ao mRNA através do domínio RRM1, de forma que a energia liberada por esta ligação induz uma mudança conformacional na proteína que leva a interações adicionais do domínio RRM2 com o mRNA, dando origem à conformação fechada.

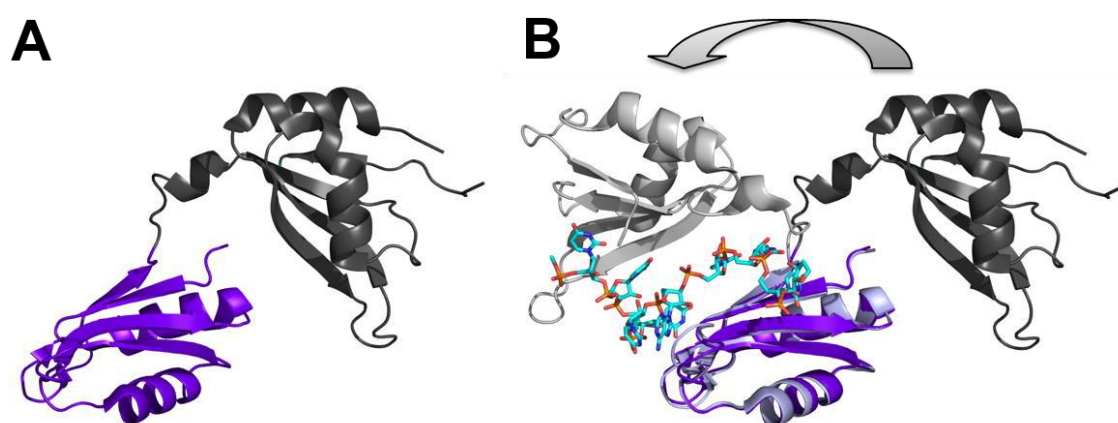


Figura 3: Estrutura cristalográfica dos domínios amino-terminais RRM1-2 de HuR na ausência e presença de RNA. (A) Estrutura cristalográfica dos domínios N-terminais RRM1-2 de HuR no estado livre, evidenciando a ausência de contatos entre os domínios e a conformação aberta adotada pela proteína (PDB 4EGL). O domínio RRM1 está colorido em cinza, enquanto o RRM2, em roxo. **(B)** Sobreposição entre a estrutura cristalográfica dos domínios RRM1-2 de HuR no estado livre e ligado ao substrato de RNA 5'-AUUUUUAUUU-3'. A estrutura tridimensional dos domínios RRM1-2 ligados a RNA está representada em tons claros. Como em A, o domínio RRM1 está colorido de cinza e o domínio RRM2, de lilás. A estrutura do substrato de RNA está representada em ciano. No RNA, os átomos de nitrogênio estão coloridos de azul, os de fosfato estão coloridos de laranja e os de oxigênio, de vermelho. A sobreposição das estruturas mostra a grande mudança de conformação ocorrida na proteína com a formação do complexo RRM1-2:RNA. Na presença do ligante, os domínios RRM1-2 adotam uma conformação fechada (PDB 4ED5) (WANG et al. 2013).

Evidências experimentais obtidas em solução a partir de medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) indicam que ambas as conformações (aberta e fechada) coexistem em equilíbrio na ausência do ligante (KIM et al. 2011). Isto sugere a participação de estados conformacionais de maior energia e menos populados na dinâmica de interação, onde o ligante estabilizaria e selecionaria a conformação minoritária pré-existente. (BOEHR et al. 2009). Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo a caracterização da dinâmica conformacional do domínio RRM1-2 da HuR, a fim de esclarecer o mecanismo de reconhecimento e interação com mRNA utilizado pela proteína.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo principal caracterizar a dinâmica conformacional dos domínios amino-terminais RRM1-2 da HuR por Ressonância Magnética Nuclear e mobilidade iônica acoplada à espectrometria de massa.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Expressão dos domínios RRM1-2 de HuR;
- ✓ Purificação dos domínios RRM1-2;
- ✓ Assinalamento sequencial das ressonâncias de HuR RRM1-2;
- ✓ Caracterização da dinâmica interna de HuR RRM1-2 por Ressonância Magnética Nuclear;
- ✓ Caracterização do equilíbrio conformacional de HuR RRM1-2 por meio de mobilidade iônica acoplada à espectrometria de massa;

3. Material e métodos

3.1. Material

3.1.1. Meio Luria-Bertani (LB)

As cepas bacterianas foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) composto de triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 5 g/L (Sigma). O meio LB sólido foi acrescido de ágar 15 g/L. Os meios seletivos foram adicionados de canamicina 100 µg/mL. O estoque do antibiótico foi preparado em água milliQ e esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm em uma concentração de 100 mg/mL.

3.1.2. Meio mínimo (M9)

O meio mínimo de cultura (M9) foi constituído de Na₂HPO₄ 48 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NaCl 8 mM, MgSO₄ 2 mM, CaCl₂ 0,1 mM, Tiamina (vitamina B1) 0,04 mM, Glicose-¹³C 3g e ¹⁵NH₄Cl 1 g.

3.1.3. Cepas bacterianas

Duas cepas bacterianas foram utilizadas, uma para armazenamento e propagação dos plasmídeos e outra para a expressão da proteína. Ambas as cepas foram cedidas pela professora Bianca Cruz Neves do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A cepa *Escherichia coli* DH5-α [genótipo: F-φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1] foi utilizada para estoque plasmidial, enquanto a cepa *E. coli* BL21(DE3) [genótipo: F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm (DE3)] foi utilizada para expressão das proteínas recombinantes.

3.2. Métodos

3.2.1. Clonagem dos domínios RRM1-2 da HuR

A sequência de DNA que codifica os domínios amino-terminais RRM1-2 da HuR (resíduos 1-189) foi clonada no vetor de expressão bacteriano RP1B pela empresa especializada *Genscript USA*. O vetor RP1B fusiona a proteína de interesse a uma cauda amino-terminal formada pelos seis primeiros aminoácidos da Tiorredoxina de *E. coli* (Tio₆) seguidos de seis histidinas (His₆) e um sítio de clivagem para a protease TEV (*Tobacco Etch virus*) (MGSDKIH₆HHHHHHENLYFQGHM), além de uma cauda carboxi-terminal não-clivável de seis histidinas (His₆) (LEHHHHHH) (PETI & PAGE, 2007).

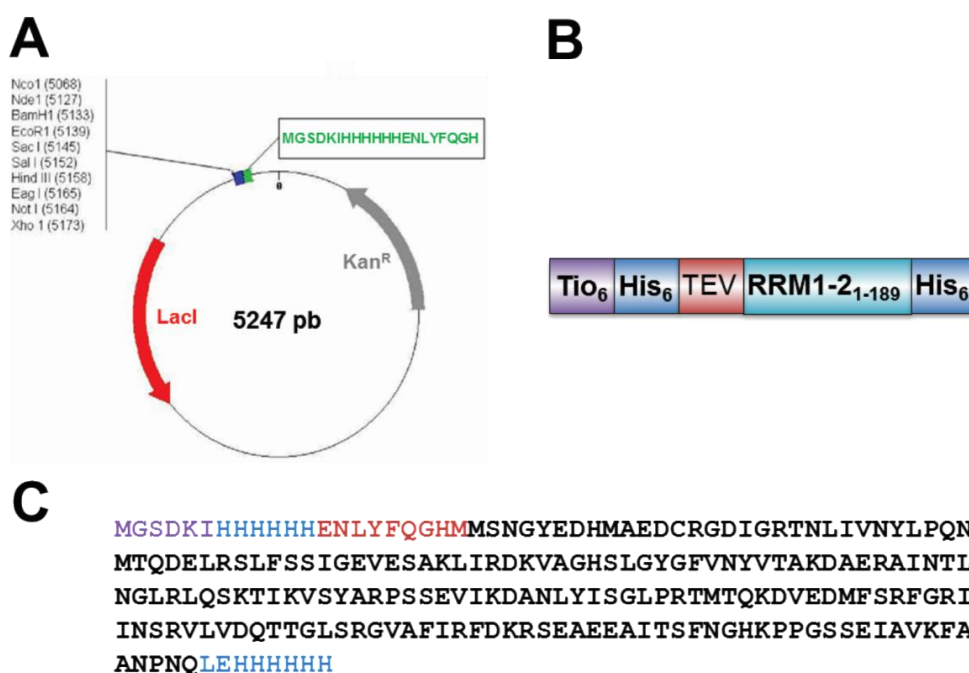


Figura 4: Representação esquemática da construção His₆-RRM1-2₁₋₁₈₉. (A) Mapa de restrição do vetor RP1B utilizado na clonagem dos domínios RRM1-2 de HuR, evidenciando o sítio de multi-clonagem, o marcador seletivo e a cauda amino-terminal Tio₆His₆-TEV. (B) Representação esquemática da proteína de fusão expressa em *E. coli*. Os domínios RRM1-2 de HuR foram fusionados a uma cauda N-terminal contendo os seis primeiros aminoácidos da tiorredoxina bacteriana (TrxA), seguidos de seis histidinas e um sítio de clivagem para a protease TEV. Além disso, o vetor RP1B também fusiona a proteína de interesse a uma cauda C-terminal não-clivável de seis histidinas. (C) Sequência primária da proteína de fusão expressa em *E. coli* (~24,6 kDa). Em roxo, os seis primeiros aminoácidos da TrxA. Em azul, as caudas de histidinas N- e C-terminais. Em vermelho, o sítio de clivagem para TEV. Após clivagem da cauda N-terminal, a construção RRM1-2₁₋₁₈₉ passou a apresentar uma massa molecular de ~22,3 kDa.

3.2.2. Transformação bacteriana

Descongelou-se 200 μL de uma cultura de *E. coli* BL21 (DE3) quimicamente competente em banho de gelo. Um volume de 2 μL de DNA plasmidial (a concentração de $\sim 35 \mu\text{g/mL}$) foi adicionado à suspensão de células. A transformação bacteriana procedeu por choque térmico. A amostra foi primeiramente incubada a 4°C por 30 min e, posteriormente, a 42°C por 45 s, seguido de incubação a 4°C por 2 min. À suspensão bacteriana, foram adicionados 800 μL de meio LB líquido e a amostra foi incubada a 37°C por 1 h sob agitação de 200 rpm. Após esse período, as células foram centrifugadas a $10.000 \times g$ por 10 min a 4°C . Foram retirados 950 μL do sobrenadante e o precipitado resultante foi ressuscitado em 50 μL de meio restante. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido seletivo, contendo canamicina $100 \mu\text{g/mL}$, e incubadas a 37°C por 16 h até que formassem colônias macroscópicas.

3.2.3. Expressão de RRM1-2₁₋₁₈₉

Células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo RP1B-RRM1-2₁₋₁₈₉ foram cultivadas em 4 mL de meio LB líquido seletivo, contendo canamicina $100 \mu\text{g/mL}$, por 6 h a 37°C sob agitação de 200 rpm. Após esse período, 100 μL da cultura bacteriana foram inoculados em 20 mL de meio M9 marcado com ^{13}C -glicose 3 g/L e/ou $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 1 g/L, contendo canamicina $100 \mu\text{g/mL}$. A cultura bacteriana foi crescida por 16 h a 37°C sob agitação de 200 rpm. Em seguida, 10 mL dessa cultura foram inoculados em 500 mL de meio M9 com ^{13}C -glicose e $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ para experimentos de assinalamento, e apenas com $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ para relaxação. As células foram crescidas a 37°C sob agitação de 200 rpm até que atingissem densidade ótica de, aproximadamente, 0,6 a 600 nm (D.O._{600}). Nesse momento, a expressão da proteína foi induzida com adição de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Sigma) 0,5 mM à cultura bacteriana. As células foram crescidas por 4 h adicionais a 37°C sob agitação de 200 rpm. Ao final da expressão, as células foram coletadas por centrifugação a $7673 \times g$ a 4°C por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante foi ressuscitado em 50 mL de tampão de lise [Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, Triton

X100 0,1 %, imidazol 5 mM, ditioneitol (DTT) 5 mM]. As células foram lisadas por sonicação realizada em ciclos (1' de sonicação em amplitude de 45% seguido de 1' em banho de gelo) utilizando um sonicador modelo DESRUPTOR da *Ultronique*. Em seguida, o *debris* celular foi removido por centrifugação a 7673 X g a 4°C por 30 min.

3.2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS PAGE)

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS PAGE) foi realizada conforme descrito por LAEMMLI (1970) (He, F. (2011). Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-protocol* Bio101: e80. <http://www.bio-protocol.org/e80>) utilizando o sistema Mini-PROTEAN Tetra (BioRad). Os géis de corrida foram preparados a partir da mistura de N,N'-metileno-bis-acrilamida 0,8% e acrilamida 30% (p/v). O gel fracionador (15%) foi preparado adicionando-se a essa mistura Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) e SDS 0,01% (p/v). A polimerização do gel se deu pela adição de persulfato de amônio P.A. (APS, do inglês *ammonium persulfate*) 10% e TEMED (Sigma). O gel concentrador (4%) foi preparado como descrito para o gel fracionador, porém utilizando Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8). Os volumes dos materiais utilizados para a preparação dos géis de eletroforese estão descritos na **Tabela 1**. Os géis de eletroforese foram corridos a 25 mA/gel durante 1 h em tampão de corrida [Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 250 mM e SDS 0,1%]. Após a separação eletroforética, as proteínas foram visualizadas por coloração com Comassie Blue R-250 (Vetec) por 15 min.

Tabela 1: Materiais utilizados na preparação dos géis para SDS PAGE

Reagente	Gel Fracionador		Gel concentrador 4% volume (mL)
	12% volume (mL)	15% volume (mL)	
Água destilada	1,67	1,15	1,22
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	1,25	1,30	—
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	—	—	0,5
SDS 10%	0,05	0,025	0,02
Bis-acrilamida 0,8%, acrilamida 30%	2,0	2,5	0,26
APS 10%	0,05	0,05	0,02
TEMED	0,01	0,01	0,002

3.2.5. Purificação de RRM1-2₁₋₁₈₉

A primeira etapa de purificação de RRM1-2₁₋₁₈₉ consistiu em uma cromatografia de afinidade a níquel. O processo foi realizado com auxílio de uma coluna HisTrap HP (GE Healthcare) acoplada a um sistema de purificação FPLC Äkta Prime plus (GE Healthcare). Após a lise celular, o sobrenadante contendo a proteína de interesse foi filtrado em membrana de poro 0,22 µm e aplicado na coluna cromatográfica, previamente equilibrada em tampão A [Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, imidazol 5 mM e DTT 5 mM]. A coluna foi então lavada com o mesmo tampão até que o traçado de absorbância a 280 nm atingisse os valores da linha base, a fim de remover os contaminantes que não interagiram com a resina de níquel. Em seguida, a proteína de interesse foi eluída com um gradiente contínuo de imidazol que variou de 5 a 500 mM. O gradiente foi criado a partir da mistura linear de tampão A com tampão B [Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, imidazol 500 mM e ditioneitol (DTT) 5 mM]. Frações de 1 mL ao longo do cromatograma de eluição foram coletadas e analisadas por SDS PAGE. As frações que continham a proteína de interesse foram unidas e incubadas com a protease His₆-TEV Nla (S219V) por 16 h a uma razão molar de 1:5 (TEV:RRM1-2₁₋₁₈₉), para separação da cauda amino-terminal His₆. Simultaneamente, a amostra foi dialisada a 4°C contra tampão [Tris-HCl 50 mM (pH 8,8) e DTT 5 mM] para a remoção do imidazol e do sal. Em seguida, a separação de RRM1-2₁₋₁₈₉ da protease His₆-TEV e da cauda His₆ se deu por cromatografia de troca aniônica realizada em coluna HiPrep Q FF 16/10 (GE Healthcare) acoplada a um sistema de purificação FPLC Äkta Prime plus (GE Healthcare). A amostra de proteína foi aplicada na coluna cromatográfica equilibrada em tampão [Tris-HCl 50 mM (pH 8,8) e DTT 5 mM]. A coluna foi lavada com o mesmo tampão até que a absorbância a 280 nm atingisse valores similares aos da linha base. A eluição de RRM1-2₁₋₁₈₉ foi feita através de um gradiente contínuo de NaCl que variou de 0 a 1 M. O gradiente foi criado a partir da mistura linear do tampão de equilíbrio e o tampão [Tris-HCl 50 mM (pH 8,8), DTT 5 mM e NaCl 2 M]. Posteriormente, as frações contendo a proteína de interesse, identificadas por SDS PAGE, foram unidas e concentradas por ultrafiltração em sistema Centricon (Millipore) com membrana de porosidade de 3000 Da. Por fim, a amostra de proteína foi submetida a

uma etapa de cromatografia por exclusão molecular utilizando uma coluna Superdex 75 PG HiLoad 16/60 (GE Healthcare) acoplada em um sistema de purificação FPLC Äkta Prime plus (GE Healthcare) equilibrada em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,0), NaCl 100 mM e DTT 5 mM. As frações contendo a proteína de interesse foram identificadas por SDS PAGE, unidas e concentradas. A concentração final da amostra foi determinada espectrofotometricamente pelo método de Pierce 660 nm.

3.2.6. Dosagem de proteínas

A concentração da amostra de proteína foi determinada através de método colorimétrico utilizando o reagente *Pierce 660 nm Protein Assay* (Thermo Scientific). Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 10 µL da amostra. A esse volume, foram adicionados 50 µL do reagente de Pierce e a mistura reacional foi incubada por 5 min ao abrigo da luz. A absorbância das amostras foi medida a 660 nm utilizando um espectrofotômetro da *Molecular Devices* modelo SpectraMax M2^e. Cada ensaio foi realizado em triplicata. As concentrações das amostras de proteína foram determinadas com base em uma curva padrão realizada com albumina bovina sérica (BSA) na faixa de 0,025 a 2 mg/mL.

3.2.7. Análise por espectrometria de massa (MS)

O grau de pureza e a massa molecular de RRM1-2₁₋₁₈₉ foram determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF. A amostra purificada de RRM1-2₁₋₁₈₉ a uma concentração de 700 µM em tampão acetato de amônio (pH 7,2) foi diluída em água ultrapura, até concentração de 10 µM – 50 µM, e misturada a uma razão de 1:1 com uma matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em acetonitrila (1/3 v/v) e TFA a 3% (5/1 v/v). Os dados de MS foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Utraflex III utilizando modo linear e um intervalo de m/z de 4000 a 30150.

3.2.8. Aquisição dos dados de RMN

Os espectros de RMN foram adquiridos a 25°C em espectrômetros Bruker Avance III 800 e 700 MHz utilizando sondas de tripla ressonância de detecção inversa com gradiente no eixo z TXI HCN (Bruker Biospin). Os experimentos utilizados na etapa de assinalamento sequencial das ressonâncias foram adquiridos com uma amostra purificada de $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -RRM1-2₁₋₁₈₉ a uma concentração de 900 μM em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,0), NaCl 100 mM, DTT 5 mM, $^2\text{H}_2\text{O}$ 10% (v/v). Enquanto, os experimentos de relaxação do núcleo de ^{15}N foram adquiridos com uma amostra purificada de ^{15}N -RRM1-2₁₋₁₈₉ a concentração de 200 μM no mesmo tampão. Os espectrômetros estão localizados no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ. A aquisição e o processamento dos espectros de RMN foram realizados com os programas Top Spin 3.1 (Bruker Biospin) e NMRPipe (DELAGLIO et al., 1995)

3.2.9. Assinalamento sequencial das ressonâncias

O assinalamento sequencial das ressonâncias da cadeia principal dos domínios RRM1-2₁₋₁₈₉ ($^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}^{\alpha}$, $^1\text{H}^{\alpha}$, $^{13}\text{C}^{\beta}$, $^{13}\text{C}'$) foi feito com base nos seguintes experimentos de RMN: 2D [^1H , ^{15}N] HSQC (8 acumulações por incremento em t_1 , 2048 pontos coletados na dimensão F_2 e 512 pontos em F_1), 3D HNCACB (16 acumulações, 1024 pontos em F_3 , 54 pontos em F_2 e 80 pontos em F_1), 3D CBCA(CO)NH (16 acumulações, 1024 pontos em F_3 , 54 pontos em F_2 e 80 pontos em F_1), 3D HNCO (8 acumulações, 1024 pontos em F_3 , 56 pontos em F_2 e 80 pontos em F_1) e 3D HNCACO (32 acumulações, 1024 pontos em F_3 , 56 pontos em F_2 e 80 pontos em F_1) (SATTLER et al. 1999). Os espectros foram analisados utilizando o programa CARA 1.8.4.2 (<http://cara.nmr.ch/doku.php>). Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram calibrados diretamente utilizando DSS (ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico) 1 mM como referência interna. Os deslocamentos químicos de ^{15}N e ^{13}C foram calibrados indiretamente utilizando a razão das constantes giromagnéticas entre os núcleos.

3.2.10. Medida dos parâmetros de relaxação

A dinâmica molecular da cadeia principal de RRM1-2₁₋₁₈₉ foi inferida a partir da medida dos parâmetros de relaxação dos núcleos de ¹⁵N: R_1 , R_2 e $\{^1\text{H}\}$ -¹⁵N NOE (STONE et al. 1992). Todos os experimentos foram adquiridos com 16 acumulações por incremento em t_1 , 1024 pontos na dimensão F_2 (¹H) e 256 pontos na dimensão F_1 (¹⁵N). As taxas de relaxação longitudinal (R_1) foram determinadas a partir das intensidades dos sinais medidos em 8 espectros de correlação heteronuclear [¹H, ¹⁵N] coletados com os seguintes tempos de relaxação: 20, 100, 300, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 ms. Enquanto, as taxas de relaxação transversal (R_2) foram determinadas a partir das intensidades dos sinais de 8 espectros coletados com os seguintes tempos de relaxação: 16,96, 33,92, 50,88, 84,80, 101,76, 135,68, 169,60 e 203,52 ms. Entre cada acumulação, foi dado um intervalo de tempo de 1,3 s para os experimentos de R_2 e de 3,0 s para os experimentos de R_1 , a fim de garantir a recuperação completa da magnetização dos núcleos de hidrogênio. O $\{^1\text{H}\}$ -¹⁵N NOE foi adquirido com e sem pré-saturação dos núcleos de hidrogênio, de maneira intercalada. Para garantir que os NOEs máximos fossem desenvolvidos antes da aquisição do experimento, foi dado um intervalo de 5 s entre cada acumulação. Os experimentos de R_1 , R_2 e $\{^1\text{H}\}$ -¹⁵N NOE foram realizados em versões pseudo-3D, onde a terceira dimensão corresponde aos diferentes tempos de relaxação, e convertidos em conjuntos de espectros 2D durante o processamento.

3.2.11. Análise dos dados de relaxação

Os valores das taxas de relaxação (R_1 e R_2) foram obtidos a partir do ajuste das intensidades das ressonâncias presentes nos espectros de correlação heteronuclear [¹H, ¹⁵N] em função dos tempos de relaxação (T) empregando uma equação de decaimento monoexponencial de dois parâmetros (STONE et al., 1992).

$$I(T) = I_0 \exp(-R_{1,2}T)$$

Onde $I(T)$ refere-se à intensidade após um intervalo de tempo (T) e I_0 , à intensidade no tempo zero. Os valores dos $\{^1\text{H}\}$ -¹⁵N NOE foram obtidos a partir da razão entre as

intensidades dos sinais presentes nos espectros coletados com e sem saturação dos hidrogênios, conforme a equação abaixo (STONE et al. 1992).

$$NOE = I_{sat}/I_{eq}$$

Os erros experimentais foram calculados a partir do desvio-padrão do ruído em relação às intensidades dos sinais de ressonância aferidas nos espectros de T_1 e T_2 , conforme a equação abaixo.

$$Erro = \left(\frac{1}{Tempo\ de\ Relaxação\ (s)} \right) \times \frac{Desvio\ padrão_{Ruído}}{Intensidade_{RRM1-2_{1-189}}}$$

Onde *Tempo de Relaxação (s)* refere-se ao tempo de relaxação do espectro escolhido; *Desvio padrão_{Ruído}*, ao desvio-padrão calculado para o ruído do espectro escolhido e *Intensidade_{RRM1-2₁₋₁₈₉}*, à intensidade dos sinais referentes aos resíduos de RRM1-2₁₋₁₈₉.

No caso do $\{^1H\}$ - ^{15}N NOE, foram utilizados os desvios-padrão do ruído de fundo dos espectros saturado e referência. Para o cálculo do desvio-padrão, aproximadamente 500 picos, positivos e negativos, que não se encontravam próximos aos sinais da amostra e ao sinal da água foram utilizados (FARROW et al., 1994).

$$\Delta NOE = \frac{Desvio\ padrão_{Ruído}^{NOE}}{Intensidade_{Ref}} - \left(\frac{Intensidade_{NOE}}{(Intensidade_{Ref})^2} \times Desvio\ padrão_{Ruído}^{Ref} \right)$$

Onde *Desvio padrão_{Ruído}^{NOE}* refere-se ao desvio-padrão calculado para o ruído do espectro saturado; *Intensidade_{Ref}*, à intensidade dos sinais referentes aos resíduos de RRM1-2₁₋₁₈₉ no espectro referência; *Intensidade_{NOE}*, à intensidade dos sinais referentes aos resíduos de RRM1-2₁₋₁₈₉ no espectro saturado e *Desvio padrão_{Ruído}^{Ref}*, ao desvio-padrão calculado para o ruído do espectro referência.

O tempo de correlação rotacional (τ_c) foi estimado para RRM1-2₁₋₁₈₉, bem como para os domínios RRM1 e RRM2 isolados, a partir dos valores médios de T_1 e T_2 considerando apenas os resíduos envolvidos em estrutura secundária, conforme a equação abaixo.

$$\tau_c \approx \frac{1}{4\pi\nu_N} \sqrt{6 \frac{T_1}{T_2} - 7}$$

Onde ν_N é a frequência de ressonância do núcleo de ^{15}N medida em Hz e T_1 e T_2 são os valores médios das taxas de relaxação do núcleo de ^{15}N (excluindo os resíduos presentes em regiões flexíveis da proteína) (KAY et al. 1989). Os dados foram analisados utilizando o programa CcpNmr Analysis 2.4.1 (VRANKEN et al., 2005).

3.2.12. Análise dinâmica por dispersão de relaxação

Movimentos internos da cadeia polipeptídica que ocorrem na escala de mili- a microssegundos e são comumente descritos como troca conformacional foram inferidos a partir de experimentos de dispersão de relaxação via CPMG (CARR & PURCELL, 1954; MEIBOOM & GILL, 1958) (DR CPMG). Os perfis de dispersão de relaxação foram adquiridos em dois campos magnéticos diferentes (11,7 e 16,5 T), utilizando uma sequência de pulsos CPMG do tipo “relaxação compensada” (LORIA et al. 1999). Os experimentos DR CPMG foram adquiridos utilizando a abordagem de tempo constante. Neste esquema, um tempo de relaxação via CPMG é definido (T_{relax}) na sequência de pulso e somente o parâmetro de frequência de CPMG (ν_{CPMG}) é modificado. Cada valor de ν_{CPMG} resulta em um único espectro e o valor de intensidade de cada ressonância é medido. Doze espectros com valores de ν_{CPMG} entre 50 e 1000 Hz ($T_{\text{relax}} = 40$ ms) foram coletados. Além disso, um espectro referência foi adquirido a $T_{\text{relax}} = 0$, fornecendo os valores de intensidade I_0 . As intensidades foram convertidas em R_2 efetivo (R_2^{eff}) utilizando a seguinte equação:

$$R_2^{\text{eff}}(\nu_{\text{CPMG}}) = \left(\frac{-1}{T}\right) \ln \frac{I_1(\nu_{\text{CPMG}})}{I_0}$$

Onde T_{relax} é o tempo total do período de refoco CPMG (40 ms), e I_0 e $I_1(\nu_{\text{CPMG}})$ são as intensidades das ressonâncias a ausência e na presença do período de refoco CPMG.

3.2.13. Análise conformacional por mobilidade iônica acoplada à espectrometria de massa (IM-MS)

Um espectrômetro de massa acoplado à mobilidade iônica apresenta uma câmara de mobilidade iônica localizada anteriormente ao analisador de massa. Íons gasosos, de um gás inerte, são injetados dentro da cela de mobilidade iônica e acelerados por um campo elétrico fraco. Devido isso, colisões de baixa energia podem ocorrer entre os íons e o gás. Quanto maior for a seção transversal do íon, maior será o número de colisões que este faz com o gás. O aumento do número de colisões promove perda de energia dos íons que, consequentemente, levam mais tempo para atravessar a cela de mobilidade iônica ("tempo de deriva"). Por conseguinte, os íons são injetados no analisador de massa e separados na razão m/z . O espectro tridimensional obtido consiste nas informações de massa, tempo de deriva e intensidade relativa (LANUCARA et al. 2014; KONIJNENBERG et al. 2013).

A amostra purificada de RRM1-2₁₋₁₈₉ a 700 μM preparada em tampão acetato de amônio 20 mM (pH 7,2) foi injetada no espectrômetro Synapt II HDMS (Waters Co., MA, EUA). Este espectrômetro é equipado com um ionizador nano-eletronspray e possui uma cela de TWIMS (*traveling wave ion mobility spectrometry*) posicionada entre o analisador quadrupolo e o analisador do tipo TOF. Os espectros foram adquiridos por infusão direta com um fluxo de 1 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ em um intervalo de m/z de 300 a 4000. O íon $[\text{M}+\text{H}]^{+10}$ foi selecionado no quadrupolo e analisado na cela *T-wave* e, posteriormente, no analisador TOF. O programa Driftscope 2.1 foi utilizado para o processamento e análise dos dados.

4. Resultados e Discussão

4.1. Purificação de RRM1-2₁₋₁₈₉

A proteína recombinante foi purificada por uma combinação de técnicas cromatográficas. O primeiro passo do processo de purificação consistiu em uma cromatografia de afinidade a níquel, uma vez que a construção His₆-RRM1-2₁₋₁₈₉ possui caudas de polihistidinas (His₆). Este processo de purificação baseia-se na interação dos resíduos de histidina com o íon metálico imobilizado ao grupo ácido iminodiacético da resina cromatográfica. As histidinas são os aminoácidos que interagem mais fortemente com esse tipo de complexo metálico porque o grupo imidazol é doador de elétrons e forma ligações de coordenação com o metal de transição imobilizado. Uma vez que a proteína com a cauda His₆ é capturada pela resina e separada do extrato proteico, esta pode ser eluída rompendo-se a interação com a resina por afinidade com um competidor (imidazol) ou por diminuição do pH (BANEYX, 1999).

A construção His₆-RRM1-2₁₋₁₈₉ foi eluída da coluna cromatográfica utilizando um gradiente contínuo de imidazol. A **Figura 5A** mostra o cromatograma de eluição, onde são observados dois picos nas concentrações de ~94 e ~177 mM de imidazol, respectivamente. A constituição proteica das amostras referentes aos picos de eluição foi avaliada por SDS PAGE. A eletroforese mostrou a presença de uma banca majoritária correndo ligeiramente acima de 25 kDa, correspondente à proteína de fusão (His₆-RRM1-2₁₋₁₈₉) (**Figura 5B**).

O próximo passo no processo de purificação consistiu em submeter a amostra de proteína à clivagem com a protease TEV (BLOMMEL & FOX, 2007). Esta protease é muito utilizada para a remoção de caudas de purificação de proteínas recombinantes por ser extremamente específica— reconhece a sequência heptapeptídica (EXXYXQ*S/G) (X pode ser qualquer resíduo) (CARRINGTON & DOUGHERTY, 1988), além de ser ativa em baixas temperaturas e na presença de vários inibidores normalmente adicionados durante o processo de purificação.

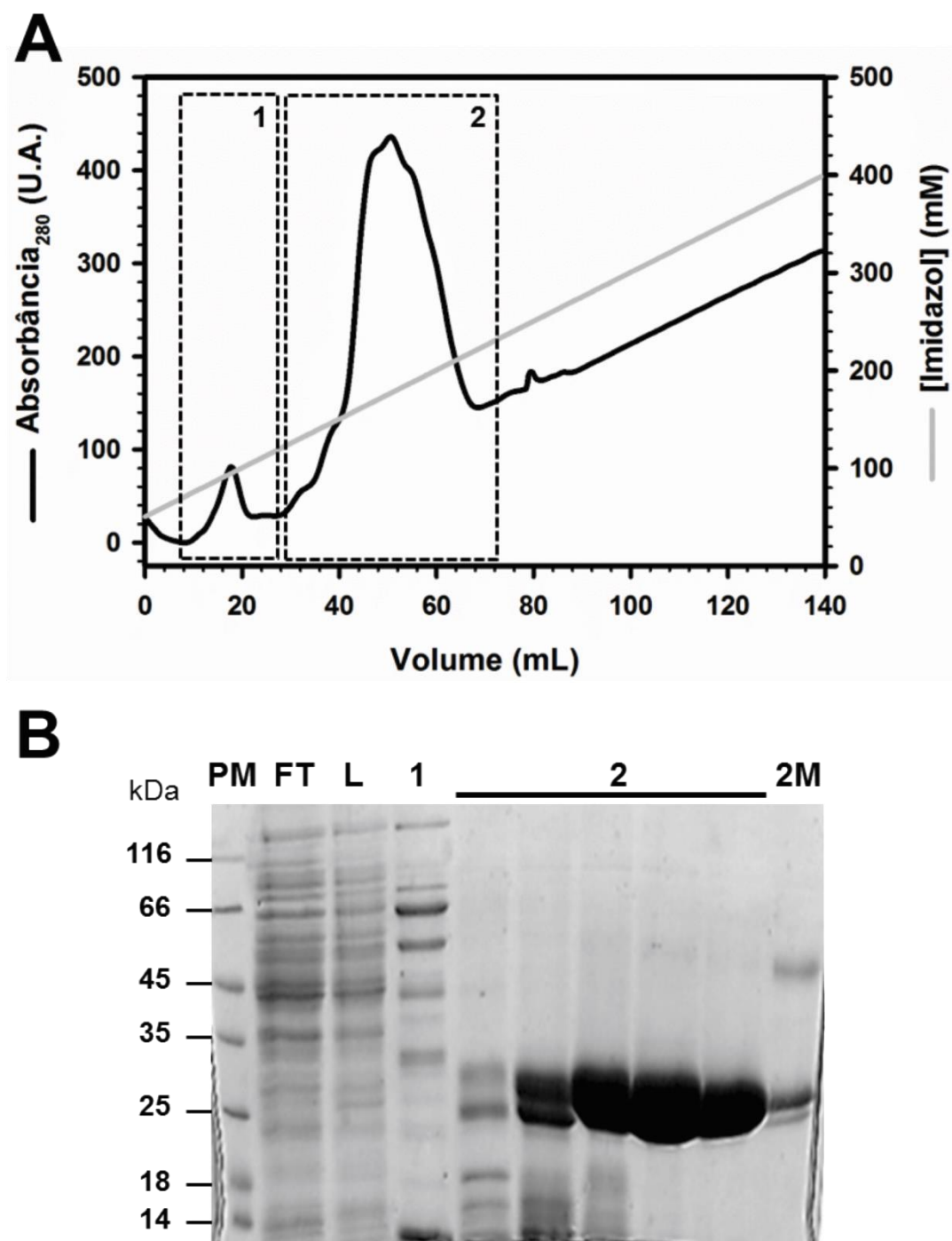


Figura 5: Purificação de His₆-RRM1-2₁₋₁₈₉ por cromatografia de afinidade a níquel. (A) Cromatograma de eluição de His₆-RRM1-2₁₋₁₈₉ da coluna de afinidade His-Trap HP (GE Healthcare), evidenciando dois picos em 94 mM (P1) e 177 mM (P2) de imidazol, respectivamente. Em preto, o traçado de absorvância a 280 nm. Em cinza, o gradiente de imidazol. **(B)** Análise por SDS PAGE das frações coletadas em **(A)**. PM: padrão de massa molecular; FT: *flow-through*; L: lavagem com tampão A [Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, imidazol 5 mM e DTT 5 mM]; 1: constituição proteica de P1 (~94 mM imidazol); 2: constituição proteica de frações coletadas ao longo de P2 (~144 mM imidazol); 2M: lavagem da coluna com tampão imidazol 2 M (pH 8,0). A proteína de fusão foi eluída ao longo de P2 e corre como uma banda acima de 25 kDa no gel de SDS PAGE.

A eficiência da clivagem da construção His₆-RRM1-2₁₋₉₉ pela protease TEV foi verificada por SDS PAGE (**Figura 6**). Após o tratamento com TEV, a banda de 25 kDa, referente ao pico de eluição da cromatografia de afinidade a níquel (~177 mM de imidazol), migrou para menor massa molecular (~25 kDa), o que pode ser explicado pela perda da cauda N-terminal His₆. Esses resultados sugerem que o protocolo estabelecido possibilitou a clivagem completa da construção His₆-RRM1-2₁₋₁₈₉.

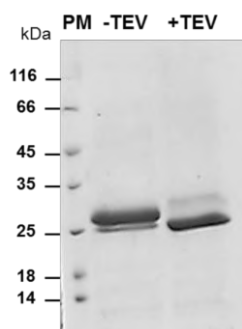


Figura 6: Clivagem de His₆-RRM1-2₁₋₁₈₉ com a protease TEV. A clivagem da cauda N-terminal His₆ foi realizada por incubação com a protease TEV (razão molar 1:5) a 4°C durante 24 h. O acompanhamento da eficiência de clivagem foi feito através de SDS PAGE. PM: padrão de massa molecular; -TEV: amostra de proteína na ausência de TEV; +TEV: amostra após 24 h de incubação com TEV. A migração da banda proteica para menor massa molecular (~25 kDa) indica clivagem completa após 24 de incubação. A banda em ~28 kDa no poço (+TEV) se refere à protease TEV.

As amostras contendo a construção RRM1-2₁₋₁₈₉ clivada foram submetidas a uma segunda etapa de purificação por cromatografia de troca aniônica. Esse procedimento teve como objetivo separar a proteína de interesse da cauda His₆ livre e da protease TEV. A **Figura 7A** mostra o cromatograma de eluição, onde se observa um único pico na concentração de 132 mM de NaCl. A avaliação do conteúdo proteico deste pico de eluição por SDS PAGE evidenciou a presença de RRM1-2₁₋₁₈₉ (~25 kDa) (**Figura 7B**).

A amostra de RRM1-2₁₋₁₈₉ foi então submetida a última etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular. A **Figura 8A** mostra o cromatograma de eluição da etapa de gel-filtração. Observa-se a presença de um único pico de eluição em um volume de retenção de 68 mL, o que é compatível com o esperado para uma proteína de ~25 kDa no seu estado monomérico. A análise por eletroforese revelou a presença de uma banda proteica de 25 kDa correspondente à construção RRM1-2₁₋₁₈₉ (**Figura 8B**).

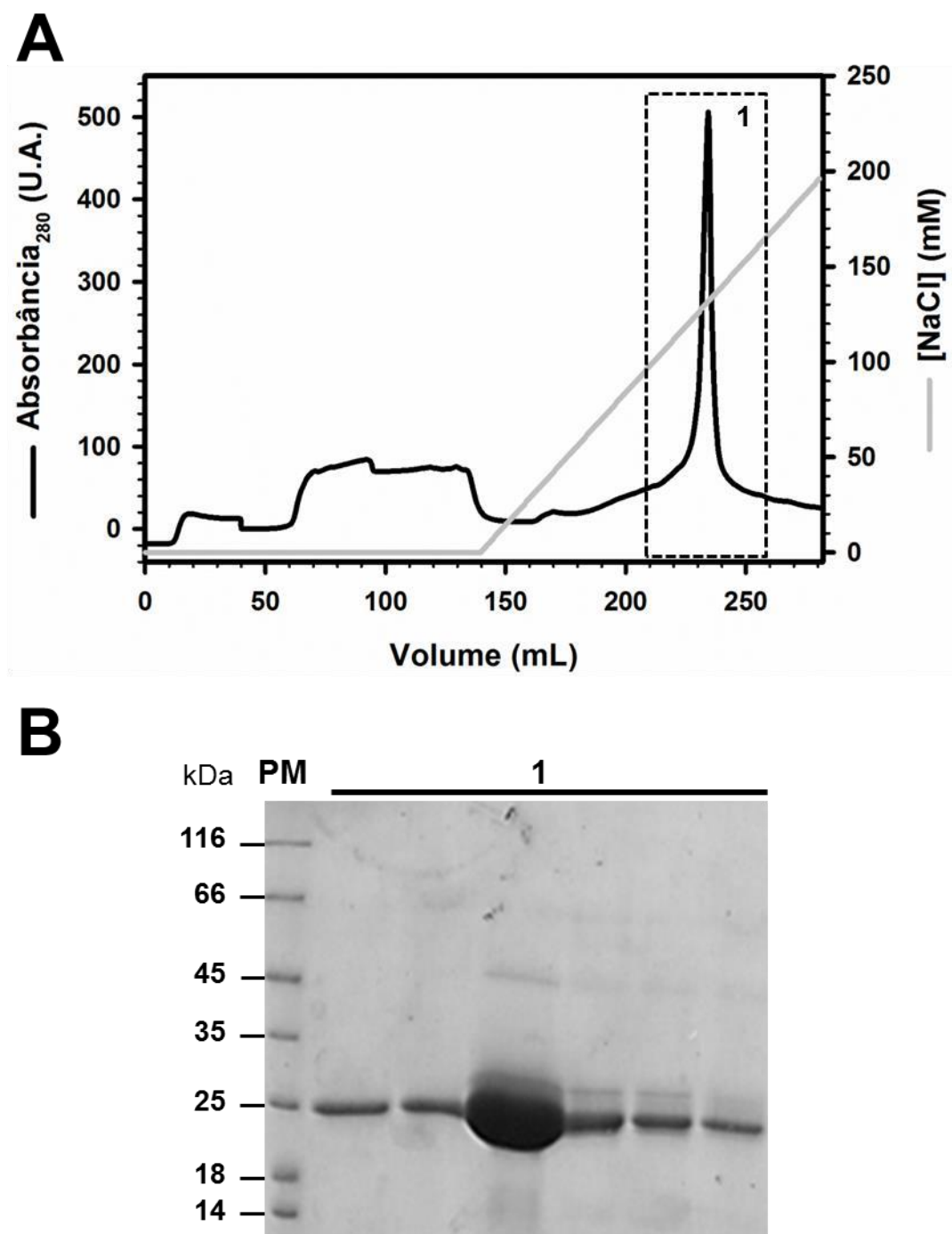


Figura 7: Purificação de RRM1-2₁₋₁₈₉ por cromatografia de troca aniônica. Cromatograma de eluição de RRM1-2₁₋₁₈₉ da coluna de troca aniônica HiPrep Q FF 16/10 (GE Healthcare), evidenciando um único pico em 132 mM de NaCl. Em preto, o traçado de absorbância a 280 nm. Em cinza, o gradiente de NaCl. **(B)** Análise de pureza das frações coletadas em **(A)** através de SDS PAGE. PM: padrão de massa molecular; 1: constituição proteica das frações coletadas ao longo de P1 (~132 mM NaCl), mostrando uma banda majoritária em ~25 kDa correspondente à RRM1-2₁₋₁₈₉.

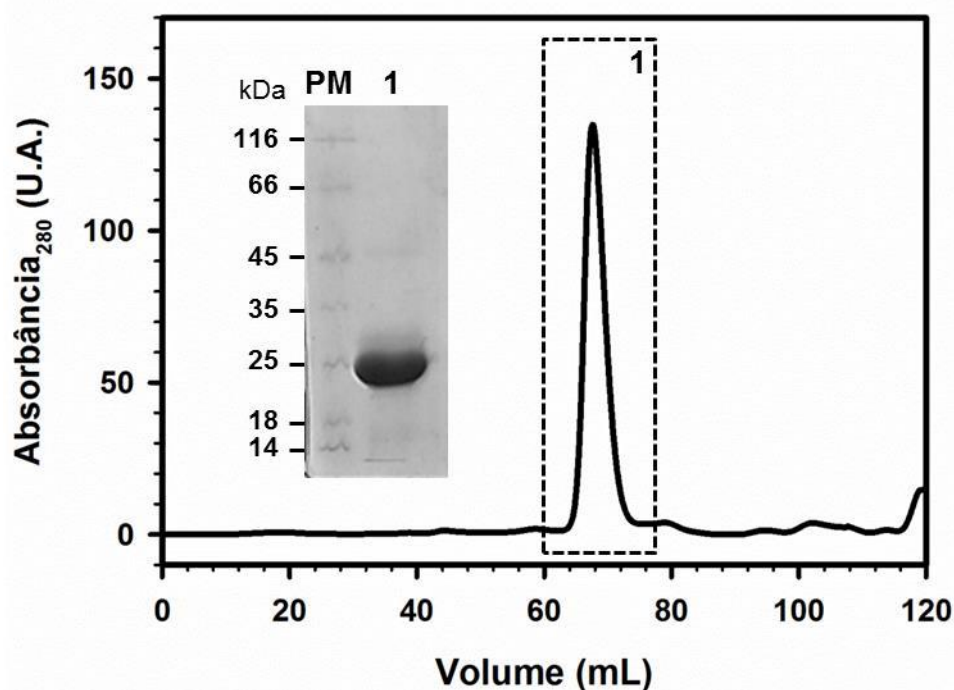


Figura 8: Purificação de RRM1-2₁₋₁₈₉ por cromatografia de gel-filtração. Cromatograma de eluição de RRM1-2₁₋₁₈₉ da coluna de gel-filtração Superdex 75 16/10 (GE Healthcare), evidenciando um único pico em 68 mL. A purificação foi realizada em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,0), NaCl 100 mM e DTT 5 mM. Em preto, o traçado de absorbância a 280 nm. De acordo com a curva de calibração da coluna cromatográfica, este volume eluição (68 mL) é condizente com um monômero globular de ~25 kDa. *Inset:* Análise por SDS PAGE das frações coletadas durante a etapa de purificação. PM: padrão de massa molecular; 1: constituição proteica fração correspondente a P1 (68 mL), evidenciando a amostra de RRM1-2₁₋₁₈₉ purificada.

A fim de analisar o grau de pureza da amostra de RRM1-2₁₋₁₈₉, experimentos de MALDI-TOF MS foram realizados (**Figura 9**). O espectro de MALDI-TOF MS mostrou a presença de três picos correspondentes às formas mono-, dupla- e triplamente carregadas de RRM1-2₁₋₁₈₉. Além disso, o espectro mostrou ausência total de outros sinais relativos a potenciais contaminantes, sugerindo o alto grau de pureza da amostra. A massa molecular média observada foi de 22335.7 Da, o que está de acordo com a massa teórica esperada de 22341.1 Da (**Figura 9**).

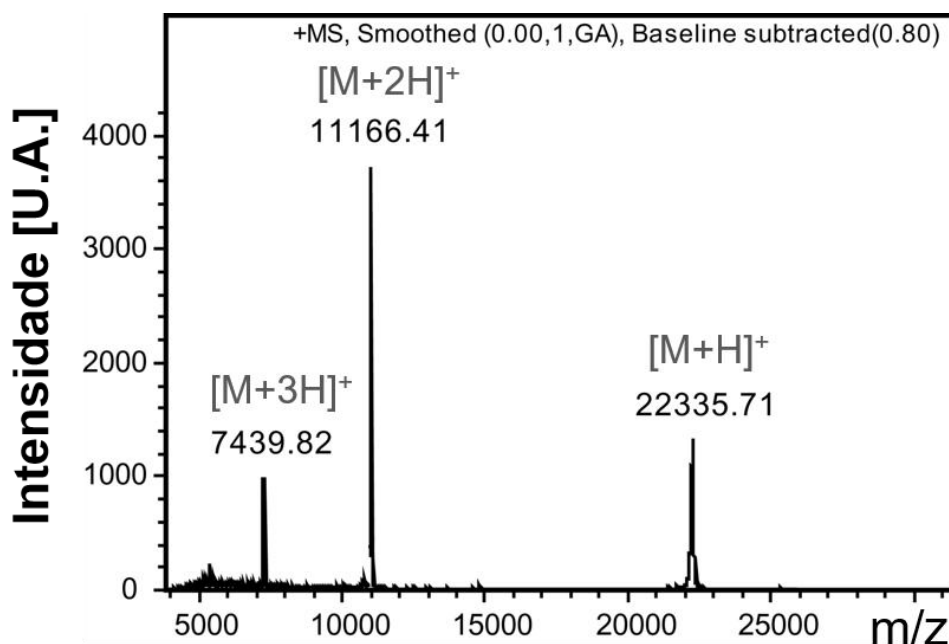


Figura 9: Análise da pureza de RRM1-2₁₋₁₈₉ por MALDI-TOF MS. A massa molecular média e a pureza de RRM1-2₁₋₁₈₉ foram determinadas por MALDI-TOF MS utilizando um espectrômetro Bruker Ultraflex III em modo linear. Os íons precursores [M+2] e [M+3] foram detectados. A massa molecular média observada foi de 22335.7 Da, enquanto a massa molecular média teórica é de 22341.1 Da.

4.2. Assinalamento sequencial das ressonâncias de RRM1-2₁₋₁₈₉

4.2.1. ¹H 1D RMN

A **Figura 10** mostra o espectro unidimensional de RMN de hidrogênio obtido para a amostra purificada de RRM1-2₁₋₁₈₉. Este espectro é compatível com o de uma proteína bem enovelada, mostrando sinais de RMN com linhas finas e uma grande dispersão de deslocamento químico na região dos hidrogênios amídicos (10-6 ppm). Além disso, a presença de sinais abaixo de 0 ppm, referentes a hidrogênios de metilas próximos espacialmente a anéis aromáticos (*ring current shifts*) presentes no cerne hidrofóbico da proteína confirma o estado enovelado deste domínio.

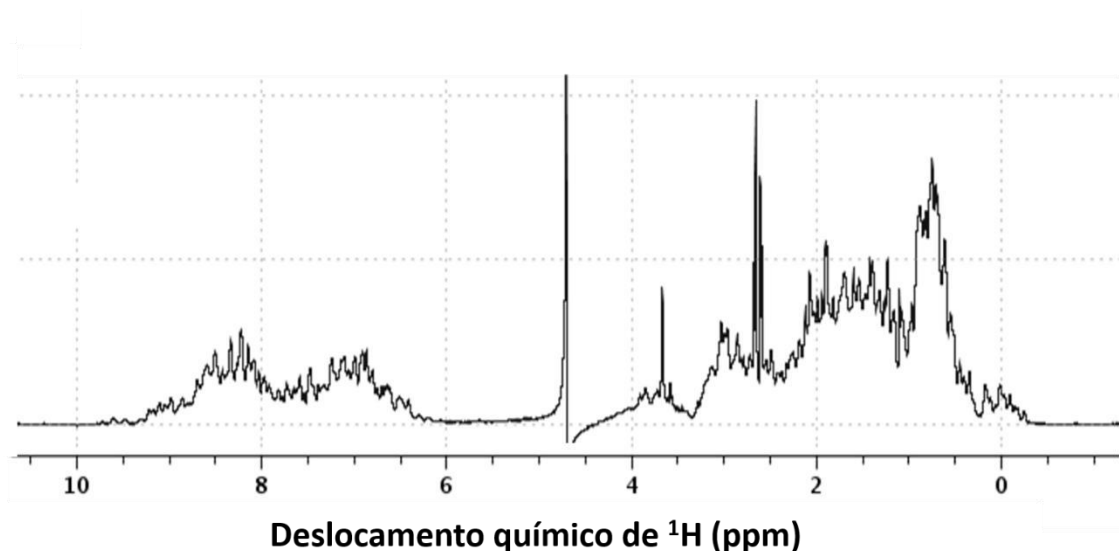


Figura 10: Espectro 1D ^1H de RRM1-2₁₋₁₈₉. A grande dispersão de deslocamento químico, assim como a distribuição homogênea das intensidades no espectro, indica que os domínios RRM1-2₁₋₉₉ encontram-se bem enovelados em solução, dessa forma os próximos experimentos podem ser realizados. O espectro foi adquirido com uma amostra purificada de ^{15}N -RRM1-2₁₋₁₈₉ (0,9 mM) em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,0), NaCl 100 mM, DTT 5 mM e 90% H_2O /10% D_2O a temperatura de 25 °C.

4.2.2. [^1H , ^{15}N] HSQC

A **Figura 11** mostra o espectro bidimensional de correlação heteronuclear [^1H , ^{15}N] HSQC (*H*eteronuclear *S*ingle *Q*uantum *C*oherence) adquirido para a amostra purificada de ^{15}N -RRM1-2₁₋₁₈₉. Esse espectro é referido como a impressão digital de uma proteína e fornece informações acerca das correlações entre hidrogênios covalentemente ligados a nitrogênios na sequência primária. Ou seja, esse espectro mostra as correlações entre os hidrogênios e nitrogênios amídicos da proteína, de forma que é gerado um pico por aminoácido da cadeia polipeptídica, com exceção das prolinas, que não possuem hidrogênio amídico. Além disso, esse espectro mostra picos de correlação para os grupos NH_2 das cadeias laterais de asparagina e glutamina, cujos valores de deslocamento químico de ^{15}N caem em torno de ~113 ppm.

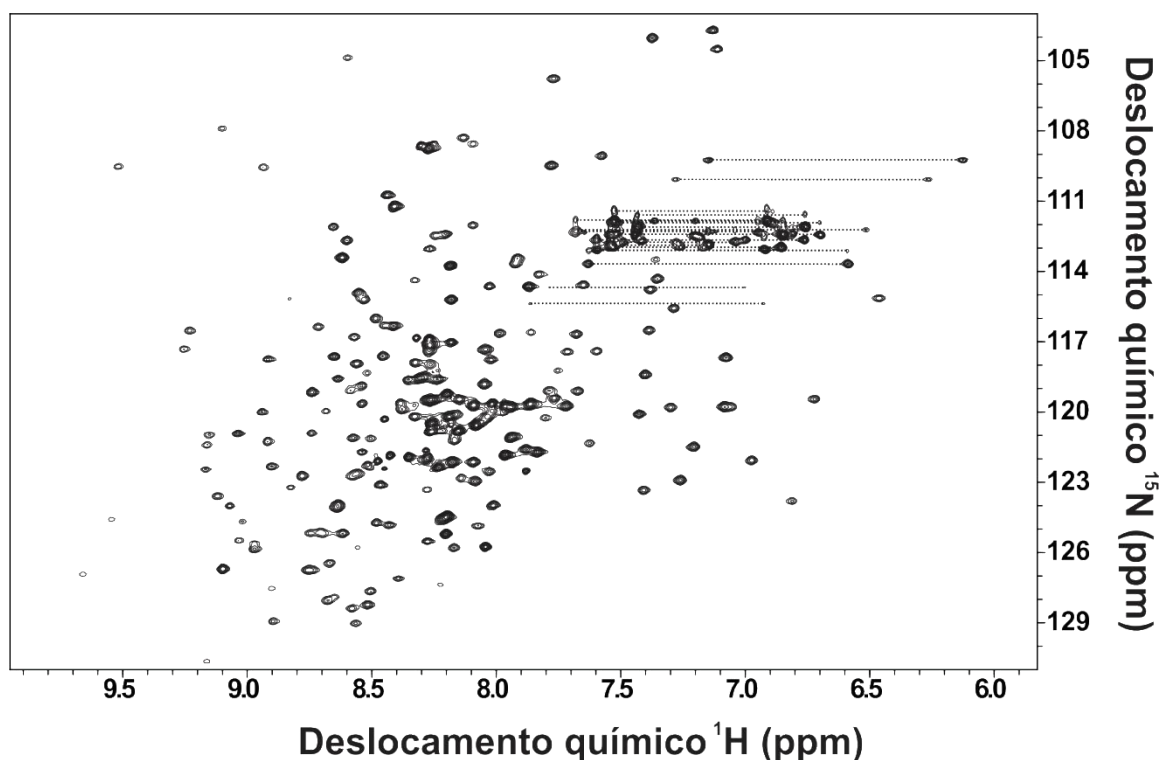


Figura 11: Espectro 2D [^1H , ^{15}N] HSQC de RRM1-2₁₋₁₈₉. As linhas tracejadas evidenciam os grupamentos NH_2 das cadeias laterais de resíduos de asparagina e glutamina. A grande dispersão de deslocamento químico, assim como a distribuição homogênea das intensidades no espectro, indica que os domínios RRM1-2₁₋₉₉ encontram-se bem enovelados em solução e atestam a viabilidade da análise dinâmica por RMN. O espectro foi adquirido com uma amostra purificada de ^{15}N -RRM1-2₁₋₁₈₉ (0,9 mM) em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,0), NaCl 100 mM, DTT 5 mM e 90% H_2O /10% D_2O a temperatura de 25 °C. Foram coletadas 8 acumulações por incremento em t_1 , 2048 pontos na dimensão F_2 e 512 pontos na dimensão F_1 .

De um modo geral, o espectro mostra sinais de ressonância bem definidos com intensidade relativamente homogênea e boa dispersão de deslocamento químico, o que é condizente com uma proteína bem enovelada. Esses resultados indicam que a amostra analisada preenche os requerimentos para os estudos por RMN, o que atesta a viabilidade do processo de caracterização dinâmica em solução. Dos 229 picos esperados para os domínios RRM1-2₁₋₁₈₉, foram encontrados 234 sinais no espectro 2D [^1H , ^{15}N] HSQC. A presença de um grupo de ressonâncias extra sugere que, nas condições estudadas, a proteína experimental troca conformacional em regime de dinâmica lenta (segundos).

4.2.3. Estratégia de assinalamento das ressonâncias

A sequência primária de uma proteína consiste em um segmento de aminoácidos unidos entre si pela ligação peptídica, onde cada aminoácido representa, individualmente, um sistema de *spins* nucleares isolados conectados via acoplamento escalar. Esses sistemas de *spins* podem ser identificados por meio das correlações via ligação química e esse processo é conhecido como assinalamento sequencial, onde os espectros de RMN são utilizados para a identificação sistemática de todos os resíduos da proteína (WÜTHRICH, 1986).

Com o assinalamento das ressonâncias, é possível associar cada núcleo (sensível a RMN) da molécula a um determinado valor de deslocamento químico. Para proteínas com massas moleculares <30 kDa, a estratégia de assinalamento da cadeia principal baseia-se na atribuição sequencial dos átomos através da combinação do espectro 2D [^1H , ^{15}N] HSQC com os espectros 3D de tripla ressonância (HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCO e HNCACO), que correlacionam os núcleos de ^1H , ^{15}N e ^{13}C através das constantes de acoplamento escalar entre eles. Cada sinal do espectro 2D [^1H , ^{15}N] HSQC refere-se a um par $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ conectado via ligação covalente. Portanto, esse experimento é utilizado para identificar os deslocamentos químicos dos núcleos de hidrogênio ($^1\text{H}^{\text{N}}$) e nitrogênio amídicos (^{15}N) de cada resíduo (com exceção das prolinas) (GRZESIEK & BAX, 1992).

Para a identificação dos átomos de $^{13}\text{C}^{\alpha}$, $^{13}\text{C}^{\beta}$ e $^{13}\text{C}'$ pertencentes a cada sistema de *spins*, utiliza-se um conjunto de espectros de tripla ressonância (**Tabela 2**), de forma que esses espectros também podem ser utilizados para resolver as sobreposições de sinais que são bastante comuns em espectros de uma ou duas dimensões. A **Figura 12** mostra como é feita a análise de espectros 3D de tripla ressonância. Os sinais observados são referentes às correlações intra-resíduos (i) e inter-resíduos (i-1). O espectro 3D HNCACB consiste de quatro sinais, sendo os dois picos mais fortes referentes aos deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}^{\alpha}$ e $^{13}\text{C}^{\beta}$ de um mesmo resíduo (i), enquanto os dois picos mais fracos se referem aos deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}^{\alpha}$ e $^{13}\text{C}^{\beta}$ do resíduo anterior (i-1) (**Figura 13A**). O espectro CBCA(CO)NH descreve os sinais referentes aos $^{13}\text{C}^{\alpha-1}$ e $^{13}\text{C}^{\beta-1}$, onde observa-se o mesmo

deslocamento químico para os picos fracos encontrados no espectro HNCACB (**Figura 13B**) (IKURA et al. 1990; KAY et al. 1990). O experimento 3D HNCO correlaciona as frequências de ressonância entre o par $^1\text{H}^\text{N}/^{15}\text{N}$ de um mesmo resíduo (i) com a frequência de ressonância da carbonila ($^{13}\text{C}'$) do resíduo anterior (i-1). Portanto, o sinal observado neste espectro é referente ao $^{13}\text{C}'\text{-1}$. O experimento 3D HNCACO utiliza a transferência de magnetização via carbono alfa ($^{13}\text{C}^\alpha$) para correlacionar as frequências de ressonância do par $^1\text{H}^\text{N}/^{15}\text{N}$ com a frequência de ressonância da carbonila ($^{13}\text{C}'$). Os espectros HNCACB e CBCA(CO)NH são analisados em par. Da mesma forma, os espectros HNCO e HN(CA)CO também são analisados em conjunto.

Tabela 2: Descrição dos experimentos de RMN utilizados para o assinalamento das ressonâncias da cadeia principal de proteínas.

Experimento	Sinais observados no espectro de RMN
HNCACB	$^{13}\text{C}^\alpha$ (i-1), $^{13}\text{C}^\beta$ (i-1), $^{13}\text{C}^\alpha$ (i) e $^{13}\text{C}^\beta$ (i).
CBCA(CO)NH	$^{13}\text{C}^\alpha$ (i-1) e $^{13}\text{C}^\beta$ (i-1).
HNCO	$^{13}\text{C}'$ (i-1).
HNCACO	$^{13}\text{C}'$ (i-1) e $^{13}\text{C}'$ (i)

O primeiro passo no assinalamento sequencial das ressonâncias consiste em “andar” sobre a sequência primária da proteína através das conectividades sequenciais (i, i-1) fornecidas pelos espectros de tripla ressonância. Este processo é facilitado pelos valores dos deslocamentos químicos de ^{13}C de determinados aminoácidos em conformação randômica (**Figura 14**). O sistema de *spins* mais facilmente reconhecido é o do aminoácido glicina, uma vez que este não possui $^{13}\text{C}^\beta$ e apresenta um valor de deslocamento químico de $^{13}\text{C}^\alpha$ muito característico (~45 ppm). Além das glicinas, as serinas e treoninas também são aminoácidos fáceis de serem identificados, uma vez que são os únicos cujos valores de deslocamento químico de $^{13}\text{C}^\beta$ são maiores do que os valores de deslocamento químico de $^{13}\text{C}^\alpha$ (Thr ~62 ppm; Ser ~58 ppm). Por fim, as alaninas são os aminoácidos que possuem os menores valores de deslocamento químico de $^{13}\text{C}^\beta$ (~19 ppm).

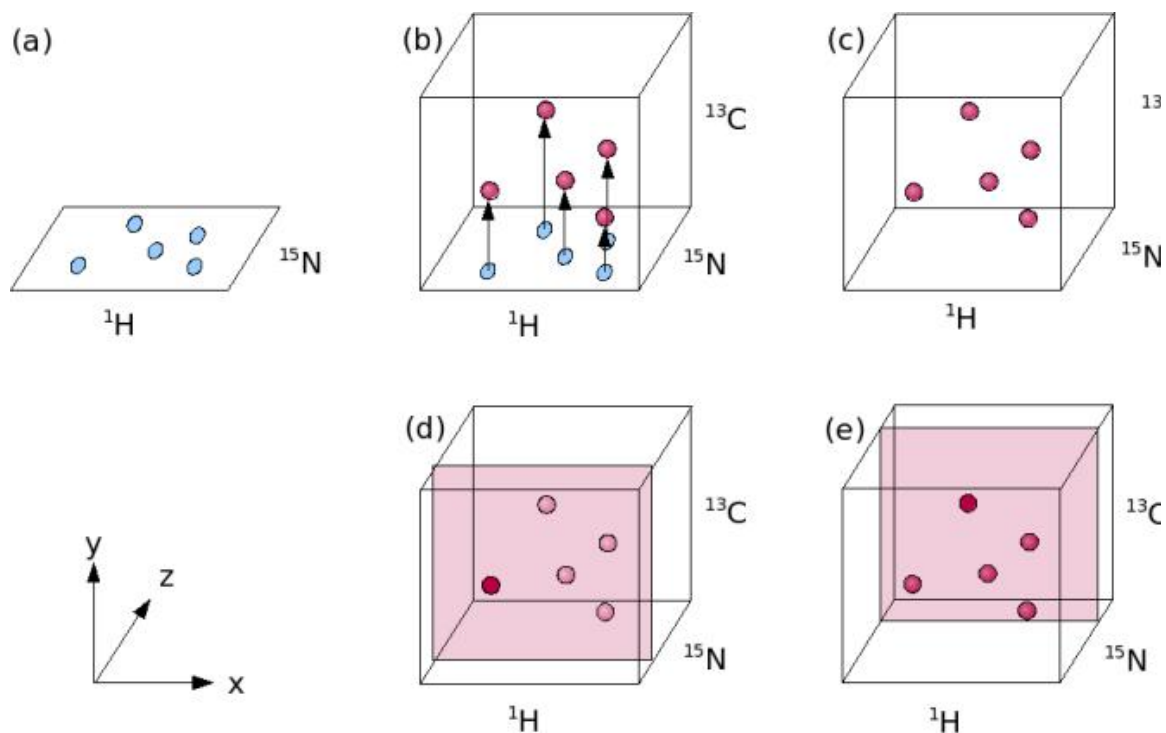
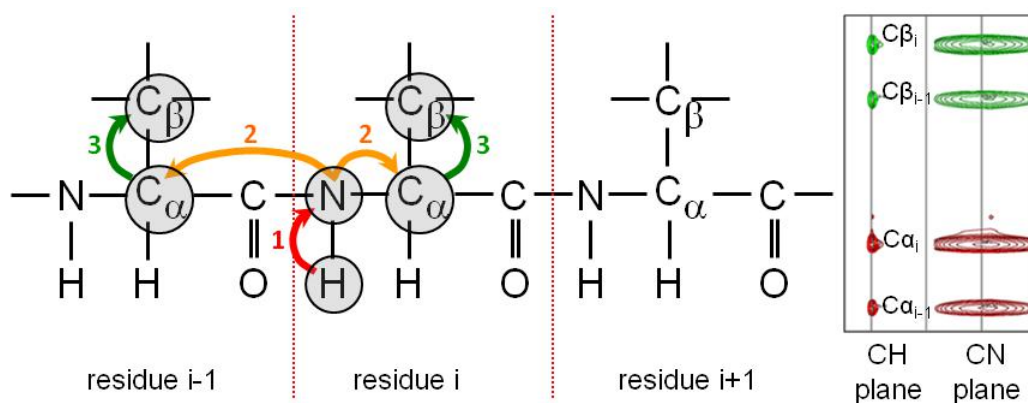


Figura 12: Representação esquemática de experimentos de RMN de dupla e tripla ressonância. (a) O espectro 2D [^1H , ^{15}N] HSQC mostra as correlações entre $^1\text{H}^{\text{N}}$ e ^{15}N , cujas frequências estão representadas nos eixos x e y, respectivamente. (b e c) O espectro 3D HNCO mostra uma extensão dos sinais para uma terceira dimensão referente às frequências de carbono $^{13}\text{C}'$. Assim, os picos do HSQC agora não ficam posicionados em apenas um plano, mas são espalhados em uma terceira dimensão de acordo com os deslocamentos químicos dos carbonos das carbonilas ($^{13}\text{C}'$) que precedem o grupo NH (d e e). A análise do espectro 3D é feita através de fatias deste cubo. O eixo x equivale à dimensão de $^1\text{H}^{\text{N}}$, enquanto a dimensão de $^{13}\text{C}'$ é geralmente vista ao longo do eixo y, deixando os deslocamentos químicos de ^{15}N no eixo z. Cada fatia do espectro 3D HNCO corresponde a um espectro 2D [^1H , ^{13}C] obtido em diferentes frequências ao longo da dimensão de ^{15}N . Adaptado de: Higman (2012).

A



B

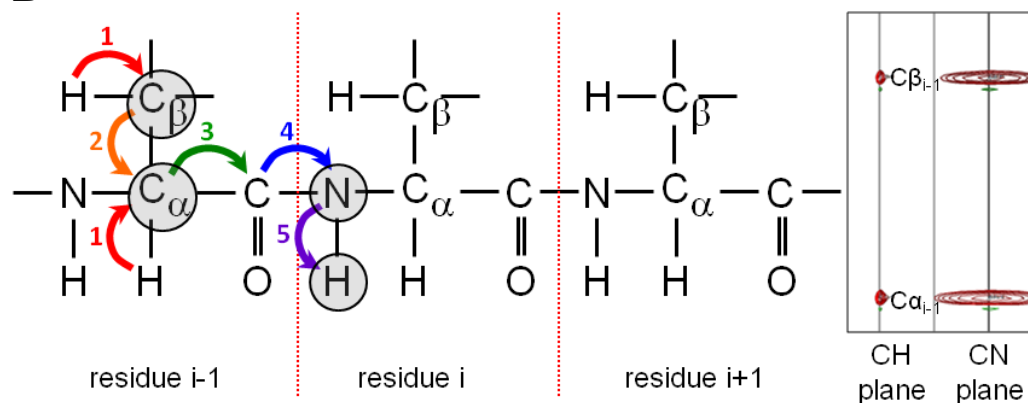


Figura 13: Representação esquemática dos espectros de tripla ressonância HNCACB e CBCA(CO)NH. Os diagramas mostram as transferências de magnetização que ocorrem nos experimentos (A) HNCACB e (B) CBCA(CO)NH. O espectro HNCACB gera quatro picos de correlação. Os picos fortes se referem às ressonâncias de $^{13}\text{C}_\alpha$ e $^{13}\text{C}_\beta$ intra-resíduos (i), enquanto os picos fracos são referentes às ressonâncias de $^{13}\text{C}_\alpha$ e $^{13}\text{C}_\beta$ do resíduo predecessor (i-1). As ressonâncias de $^{13}\text{C}_\alpha$ e $^{13}\text{C}_\beta$ são anti-fase uma em relação a outra no espectro e, por isso, estão mostradas em vermelho e verde, respectivamente. O espectro CBCA(CO)NH apresenta dois picos de correlação correspondentes às ressonâncias de $^{13}\text{C}_\alpha$ (i-1) e $^{13}\text{C}_\beta$ (i-1). A combinação destes espectros permite a o assinalamento sequencial das ressonâncias de $^{13}\text{C}_\alpha$ e $^{13}\text{C}_\beta$ da cadeia principal.

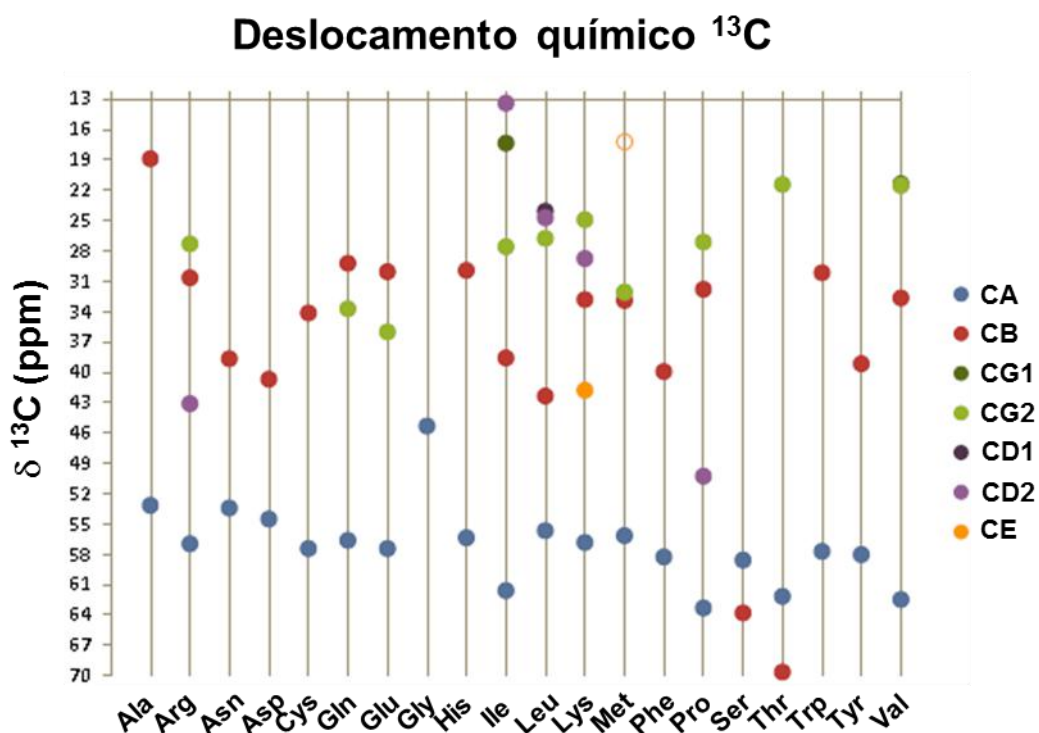


Figura 14: Valores dos deslocamentos químicos de ^{13}C dos 20 aminoácidos comumente encontrados em proteínas em conformação randômica. Adaptado de: <http://triton.iqfr.csic.es/guide/eNMR/proteins/chempro5.html>

O assinalamento sequencial das ressonâncias da cadeia principal de RRM1-2₁₋₁₈₉ foi realizado com o auxílio do programa CARA (Computer Aided Resonance Assignment) 1.8.4.2 (<http://cara.nmr.ch/doku.php>). Após a identificação de um sistema de *spins* característico (p. ex.: serina, treonina ou alanina), o programa procura por sistemas de *spins* predecessores ou sucessores através da comparação dos valores de deslocamento químico de $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$ e $^{13}\text{C}'$ fornecidos pelos espectros de tripla ressonância. O programa então alinha as frequências de $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$ e $^{13}\text{C}'$ dos picos i-1 de um determinado sistema de *spins* com aquelas dos picos i de outro sistema, identificando as conectividades sequenciais. Após a identificação de diversos sistemas de *spins* que estão sequencialmente conectados, estes podem ser assinalados a determinados aminoácidos por comparação do padrão de conectividades encontrado com a sequência primária da proteína.

Vale ressaltar a importância de se ter três possibilidades de conectividades sequenciais ($^{13}\text{C}^\alpha$ e $^{13}\text{C}^\alpha-1$, $^{13}\text{C}^\beta$ e $^{13}\text{C}^\beta-1$, $^{13}\text{C}'$ e $^{13}\text{C}'-1$), uma vez que isto permite a atribuição das ressonâncias de forma não ambígua. Frequentemente, o par de espectros HNCO e HNCACO é utilizado para resolver as ambiguidades das possibilidades de assinalamento encontradas quando apenas o par de espectros HNCACB e CBCA(CO)NH são utilizados. As ambiguidades de assinalamento podem ocorrer devido a problemas de sobreposição de sinais nestes espectros, por isso a importância em disponibilizar três caminhos diferentes para percorrer a sequência primária da proteína. A **Figura 15** mostra tiras dos espectros CBCA(CO)NH e HNCACB coletados para os domínios RRM1-2₁₋₁₈₉, evidenciando um segmento da proteína que foi assinalado através desta estratégia de conectividades sequenciais.

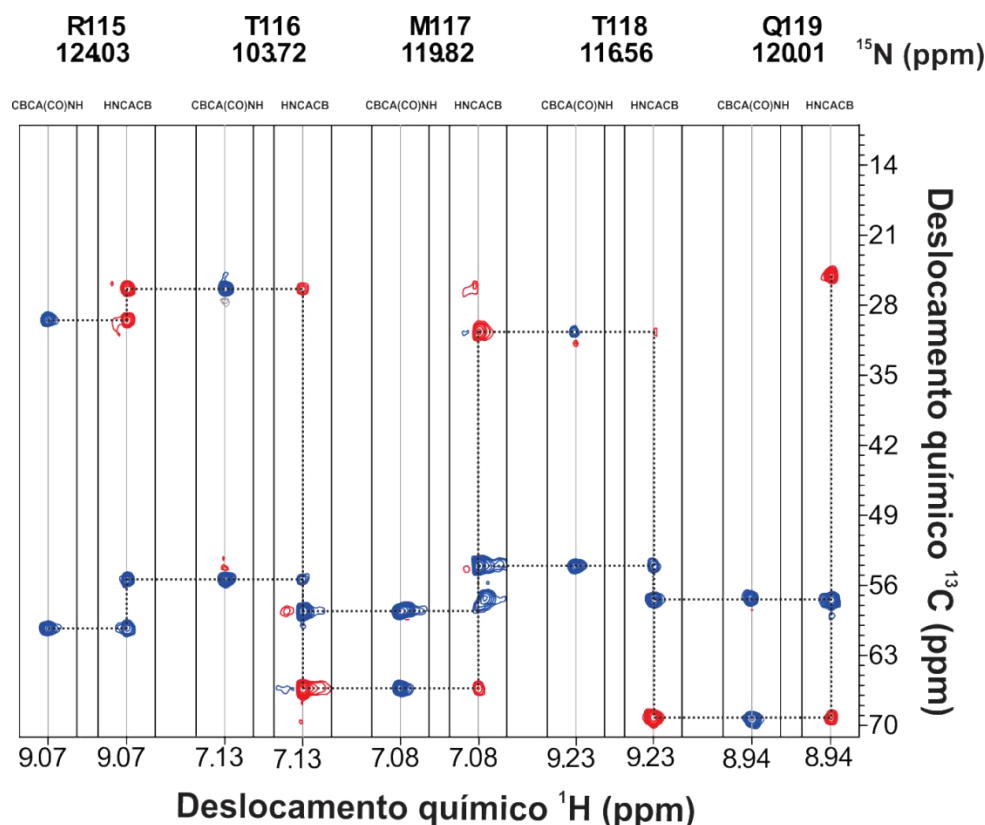


Figura 15: Fatias dos espectros CBCA(CO)NH e HNCACB coletados para RRM1-2₁₋₁₈₉. Cada tira individual mostra as conexões C α (azul) e C β (vermelho) de um mesmo resíduo (i) com o resíduo anterior (i-1). O assinalamento do segmento R¹¹⁵-T¹¹⁶-M¹¹⁷-T¹¹⁸-Q¹¹⁹ está evidenciado. As linhas pontilhadas indicam as conectividades sequenciais utilizadas para o assinalamento.

A análise dos espectros de tripla ressonância permitiu o assinalamento de 98% das ressonâncias da cadeia principal de RRM1-2₁₋₁₈₉, com exceção dos resíduos Met1, Ile152 e Ile179, onde a ausência ou sobreposição de sinais tornou o assinalamento impossível. De maneira análoga, não foi possível assinalar as ressonâncias referentes aos resíduos Gly(-2), His(-1) e Met0, que compõem o artefato de clonagem amino-terminal presente na construção RRM1-2₁₋₁₈₉, devido à ausência de sinais no espectro. Além disso, a cauda carboxi-terminal de seis histidinas, outro artefato de clonagem presente na construção RRM1-2₁₋₁₈₉, também não foi assinalada devido as ambiguidades nos deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$ e $^{13}\text{C}'$. Novamente, vale ressaltar que no espectro 2D [^1H , ^{15}N] HSQC foram observadas 5 ressonâncias extras. Algumas destas ressonâncias podem estar relacionadas a grupamentos NH da cadeia lateral de resíduos de lisina e arginina que, por estarem protegidos na estrutura da proteína, não sofreram troca química com a água e deram origem a sinais no espectro. Ainda, a presença de um grupo de ressonâncias excedentes sugere a existência de outra(s) conformação(ões) minoritária(s) de RRM1-2₁₋₁₈₉ em solução. A **Figura 16** mostra o espectro [^1H , ^{15}N] HSQC completamente assinalado. Em azul, estão marcados os sinais referentes à cauda carboxi-terminal de seis histidinas. Em vermelho, estão marcadas as ressonâncias extras que não foram assinaladas.

4.2.4. Comparação com o assinalamento de RRM1₁₋₉₉

A fim de se obter informações estruturais acerca do domínio RRM1 isolado e no contexto dos domínios amino-terminais RRM1-2 em *tandem*, os deslocamentos químicos obtidos para a construção RRM1-2₁₋₁₈₉ foram comparados com aqueles obtidos para a construção RRM1₁₋₉₉ (MUJO et al., 2014). A **Figura 17A** mostra a sobreposição dos espectros [^1H , ^{15}N] HSQC obtidos para o par de domínios RRM1-2₁₋₁₈₉ e o domínio RRM1₁₋₉₉ isolado, onde é possível observar que as ressonâncias de hidrogênio e nitrogênio amídicos são praticamente sobreponíveis em toda extensão da proteína. A **Figura 17B** mostra a quantificação das diferenças de deslocamento entre os dois espectros a partir das medidas

de perturbação de deslocamento químico (CSP). Com exceção das terminações amino e carboxi, que são flexíveis, os valores de CSP são extremamente baixos para todo o restante da proteína, sugerindo que existem poucos contatos entre os domínios amino-terminais RRM1-2₁₋₁₈₉ e que, portanto, estes se comportam praticamente como módulos estruturais independentes em solução.

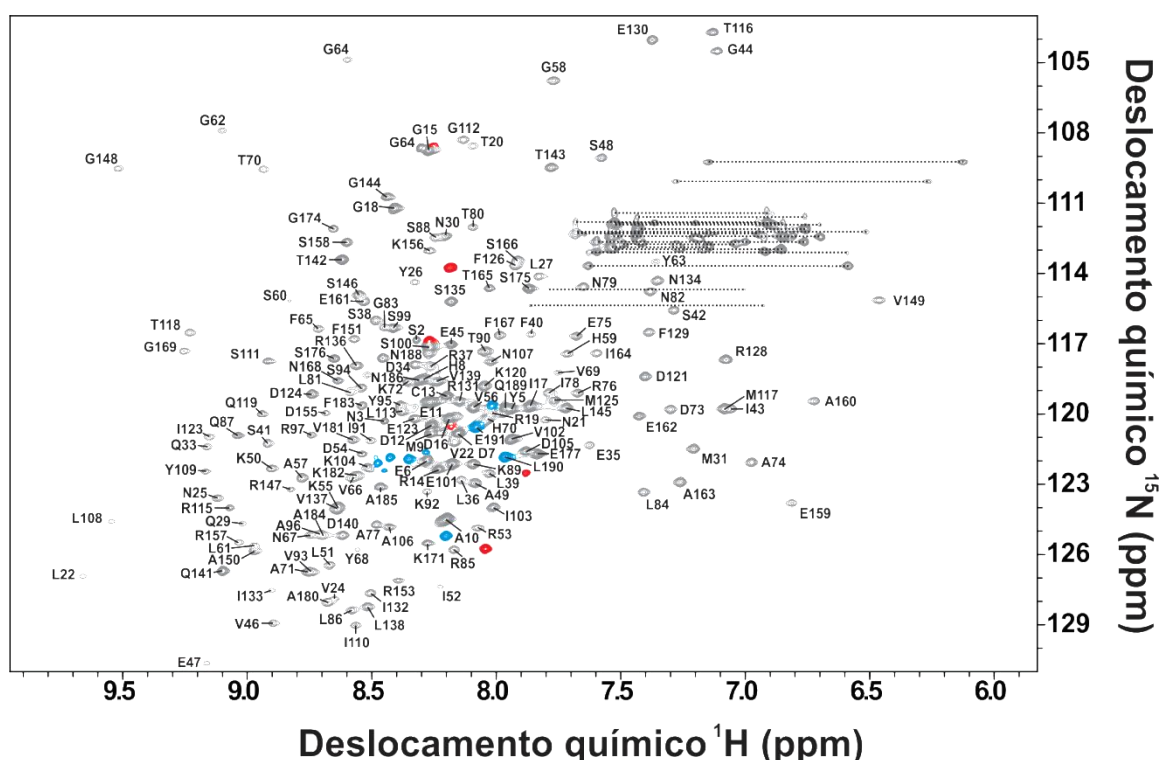


Figura 16: Espectro 2D [^1H , ^{15}N] HSQC de RRM1-2₁₋₁₈₉ assinalado. Cada pico presente no espectro está marcado com o nome, em código de uma letra, e o número do resíduo de aminoácido correspondente. As linhas tracejadas mostram os grupamentos NH_2 das cadeias laterais de resíduos de asparagina e glutamina. Os sinais marcados em azul correspondem à cauda carboxi-terminal de seis histidinas, introduzida durante a clonagem, enquanto os picos marcados em vermelho correspondem a ressonâncias extras que não foram assinaladas. O espectro foi adquirido com uma amostra purificada de ^{15}N -RRM1-2₁₋₁₈₉ (0,9 mM) em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,0), NaCl 100 mM, DTT 5 mM e 90% H_2O /10% D_2O a temperatura de 25 °C. Foram coletadas 8 acumulações por incremento em t_1 , 2048 pontos na dimensão F_2 e 512 pontos na dimensão F_1 .

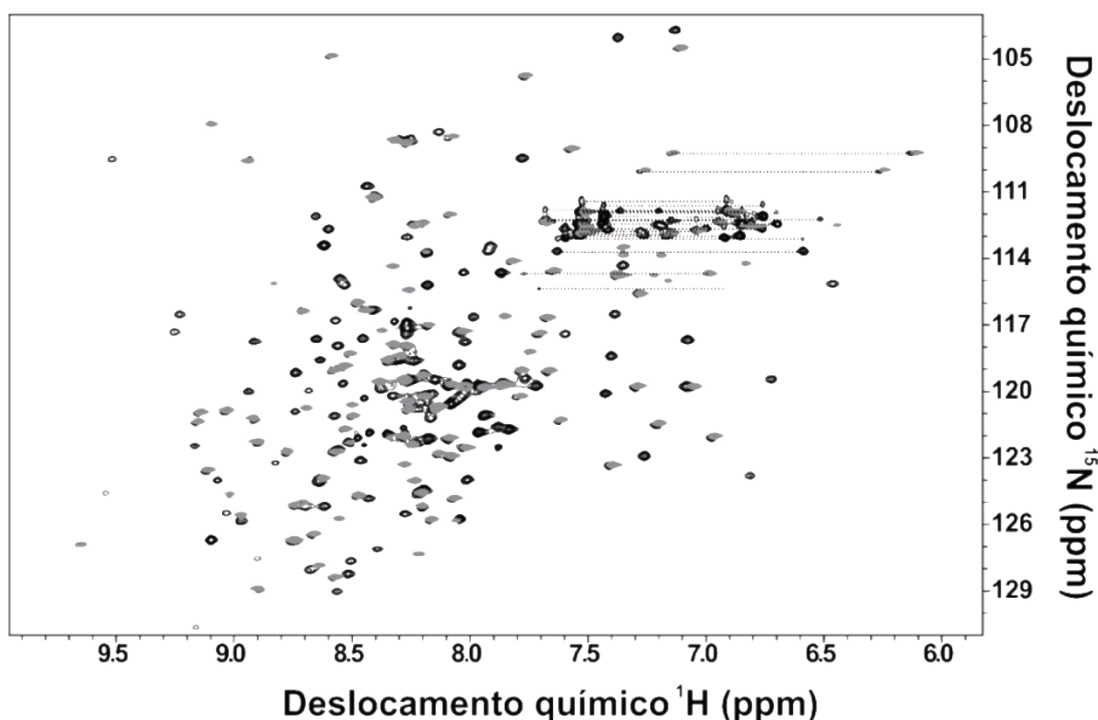
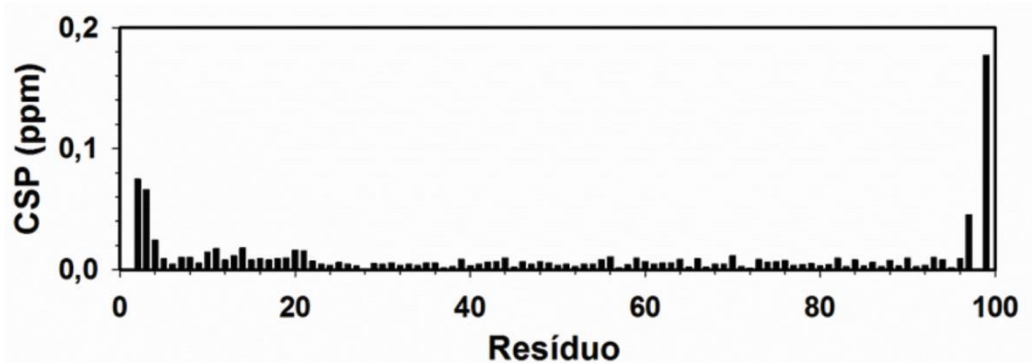
A**B**

Figura 17: Comparação dos deslocamentos químicos de RRM1-2₁₋₁₈₉ em *tandem* e RRM1₁₋₉₉ isolado. (A) Sobreposição dos espectros [¹H,¹⁵N] HSCQ adquiridos para os domínios amino-terminais RRM1-2₁₋₁₈₉ em *tandem* (preto) e para o domínio RRM1₁₋₉₉ isolado (cinza). **(B)** Quantificação das diferenças de deslocamento químico de hidrogênio e nitrogênio amídicos entre o par de domínios RRM1-2₁₋₁₈₉ e o domínio individual RRM1₁₋₉₉ a partir das medidas de CSP (*chemical shift perturbation*). Observa-se que os deslocamentos químicos referentes ao domínio RRM1 isolado e no contexto da construção RRM1-2 são semelhantes, sugerido pouca interação entre os domínios e que estes atuam como módulos estruturais independentes em solução.

4.2.5. Caracterização dinâmica de RRM1-2₁₋₁₈₉

A dinâmica da cadeia principal dos domínios RRM1-2₁₋₁₈₉ foi monitorada através das medidas das taxas de relaxação do núcleo de ¹⁵N (R_1 , R_2 e $\{^1\text{H}\}$ -¹⁵N NOE). Para o cálculo das taxas de relaxação longitudinal (R_1) e transversa (R_2), o ajuste das intensidades das ressonâncias foi feito por regressão não-linear utilizando uma equação de decaimento monoexponencial de dois parâmetros. O valor do $\{^1\text{H}\}$ -¹⁵N NOE de cada resíduo foi determinado como sendo a razão entre as intensidades dos picos presentes nos espectros coletados com e sem saturação dos hidrogênios.

Os valores dos parâmetros de relaxação R_1 , R_2 e $\{^1\text{H}\}$ -¹⁵N NOE, bem como os erros associados a cada medida, obtidos para os domínios RRM1-2₁₋₁₈₉ estão mostrados na **Figura 18**. Os resultados indicam que os 19 primeiros aminoácidos de RRM1-2₁₋₁₈₉ são altamente flexíveis, ou seja, apresentam dinâmica interna rápida (na faixa de pico- a nanosegundos), como indicado pelos altos valores de R_1 associados aos baixos valores de R_2 e $\{^1\text{H}\}$ -¹⁵N NOE. Isto sugere que esses resíduos constituem um segmento da proteína que se encontra desestruturado em solução. Além da região amino-terminal, os resíduos que compõem a região de conexão entre os domínios RRM1 e RRM2 (Ser99 – Asp105) também exibem dinâmica térmica, ou seja, são flexíveis em solução.

A **Figura 19** resume os resultados encontrados para os movimentos internos que acontecem na escala de pico- a nanosegundos, ditos movimentos térmicos. Tais movimentos podem ser inferidos através das medidas de $\{^1\text{H}\}$ -¹⁵N NOE. Valores de $\{^1\text{H}\}$ -¹⁵N NOE de aproximadamente 0,8 são esperados para regiões rígidas da proteína, geralmente observadas em elementos de estrutura secundária. Em contrapartida, baixos valores de $\{^1\text{H}\}$ -¹⁵N NOE, tipicamente abaixo de 0,65, indicam que estes resíduos são flexíveis. Para RRM1-2₁₋₁₈₉, excetuando-se os 19 primeiros aminoácidos que constituem uma região intrinsecamente desordenada, o valor de $\{^1\text{H}\}$ -¹⁵N NOE médio foi de $0,72 \pm 0,13$. Determinados resíduos apresentaram valores de $\{^1\text{H}\}$ -¹⁵N NOE abaixo da média (dois desvios-padrão), são eles: Val56, Gly58 e His59 (presentes no *loop* L3 do domínio RRM1); Ser88 (presente no *loop* L5

do domínio RRM1); Ser99, Ser100, Glu101, Val102, Ile103, Lys104 e Asp105 (presentes na região de conexão inter-domínios); Phe126 (presente na hélice $\alpha 1$ do domínio RRM2); Asp140, Thr142, Lys 145 (presentes no *loop* L3' do domínio RRM2); Gly174, Ser 175, Ser176, Glu177 (presentes no *loop* L5' do domínio RRM2). Em conjunto, estes resultados indicam que, além da extensão amino-terminal e da região de conexão inter-domínios, os loops L3, L3' e L5' dos domínios RRM1 e RRM2, respectivamente, são flexíveis em solução.

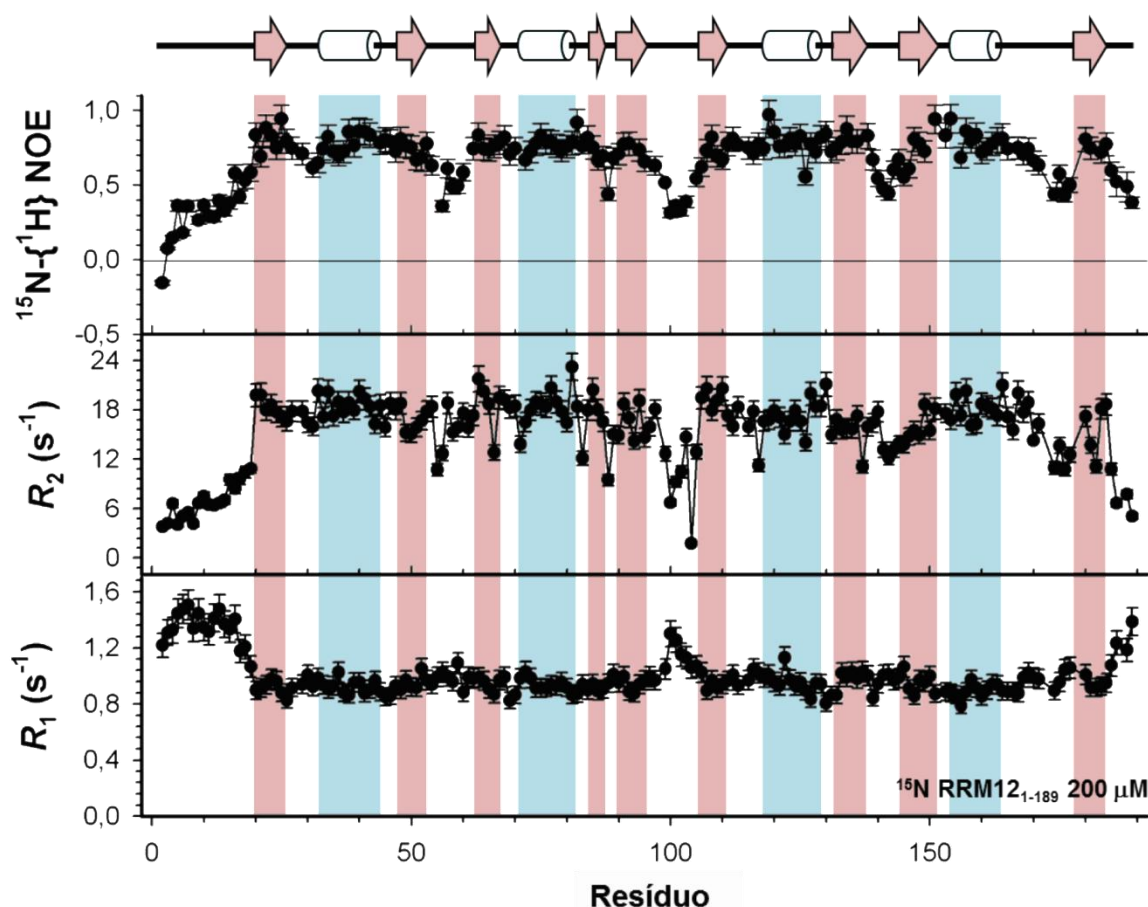


Figura 18: Parâmetros de relaxação do núcleo de ^{15}N medidos para RRM1-2₁₋₁₈₉. Os valores de R_1 , R_2 e $\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE estão mostrados em função do número de resíduos da proteína. As barras representam os erros associados a cada medida. Os elementos de estrutura secundária estão mostrados no topo da figura, de acordo com a estrutura cristalográfica de RRM1-2₁₋₁₈₉ (PDB 4EGL). As setas representam as fitas- β , enquanto os cilindros, as α -hélices. As caixas vermelhas e azuis delimitam os aminoácidos que participam de fitas- β e α -hélices, respectivamente. O espectros de T_1 , T_2 $\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE foram adquiridos com uma amostra purificada de ^{15}N -RRM1-2₁₋₁₈₉ (0,2 mM) em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,0), NaCl 100 mM, DTT 5 mM e 90% H_2O /10% D_2O a temperatura de 25 °C. Foram coletadas 16 acumulações por incremento em t_1 , 1024 pontos na dimensão F_2 e 256 pontos na dimensão F_1 .

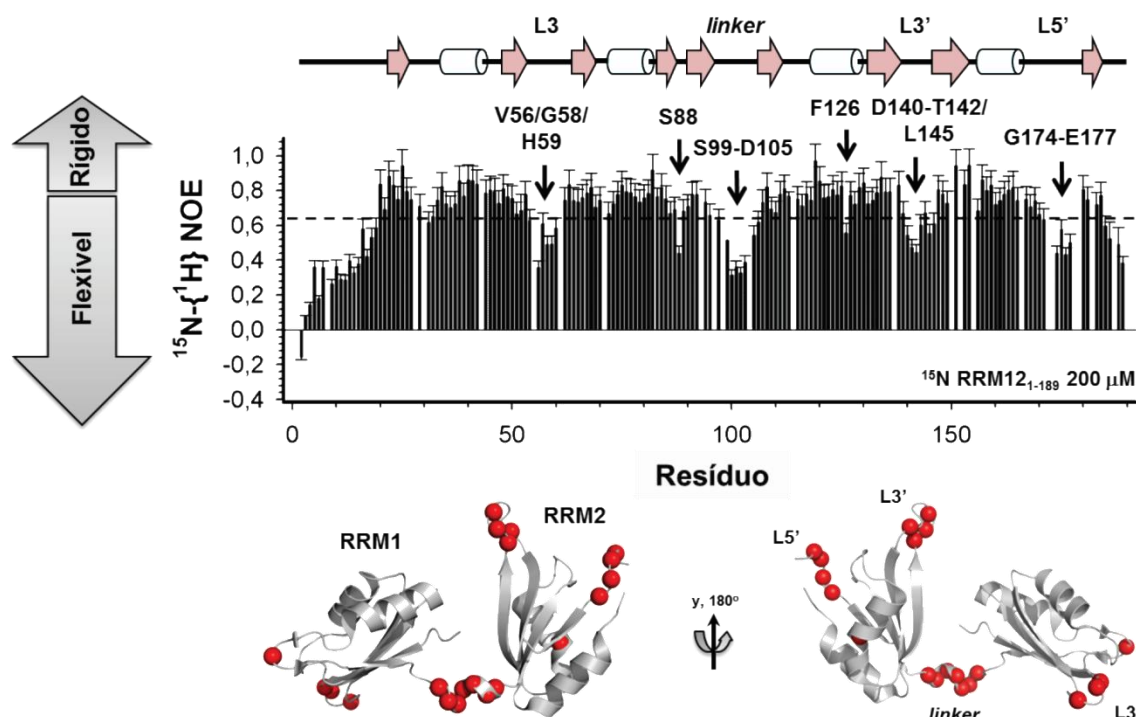


Figura 19: Resumo da dinâmica térmica (ps-ns) de RRM1-21-189. Os valores de $\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE estão mostrados em função do número de resíduos da proteína. As barras representam os erros associados a cada medida. Os elementos de estrutura secundária estão mostrados no topo da figura, de acordo com a estrutura cristalográfica de RRM1-21-189 (PDB 4EGL). As setas representam as fitas- β , enquanto os cilindros, as α -hélices. O $\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE médio foi de $0,72 \pm 0,13$. Resíduos que apresentarem valores de $\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE abaixo de dois desvios-padrão da média estão marcados na figura. Estes resíduos estão marcados como esferas vermelhas na estrutura cristalográfica de RRM1-21-189 livre, evidenciando que os *loops* L3 (RRM1), L3', L5' (RRM2) e o *linker* inter-domínios constituem as regiões mais flexíveis da proteína.

A partir dos valores médios das taxas de relaxação longitudinal e transversa, estimou-se o tempo de correlação rotacional global (τ_c) para RRM1-21-189, bem como para os domínios individuais RRM1 e RRM2, assumindo um processo de difusão rotacional isotrópico. Um valor de τ_c de 11 ns foi encontrado para a proteína como um todo, enquanto os valores de 11,7 e 10 ns foram estimados para os domínios individuais RRM1 e RRM2, respectivamente. Um valor de τ_c de ~16 ns seria esperado para uma proteína globular de 23 kDa, caso os dois domínios RRM tombassem juntos em solução (SCHELHORN et al. 2014; DARAGAN et al. 1997). A observação de que os valores de τ_c obtidos para os domínios RRM1 e RRM2 são diferentes entre si e menores do que o esperado para uma proteína globular de mesma massa molecular sugere que estes tombem, ou seja, rotacionem, em solução de maneira

independente. Portanto, os dados de relaxação em conjunto com a grande semelhança de deslocamento químico exibida pelo domínio RRM1 isolado e no contexto da construção RRM1-2₁₋₁₈₉ indicam que os domínios amino-terminais de HuR atuam como módulos estruturais independentes, sem que haja interações fortes entre eles.

Embora os dados de relaxação e de perturbação de deslocamento químico sugiram que os domínios RRM1 e RRM2, na ausência de RNA, tombem de maneira independente em solução, não podemos excluir a possibilidade da existência de contatos fracos de natureza transiente entre os dois domínios. Estes contatos transientes podem levar a população de outras conformações em solução, mais compactas do que a conformação majoritária resolvida por cristalografia de raios-X. Outros exemplos de RBPs que apresentam uma região inter-domínios intrinsicamente desordenada incluem TIA-1 (WANG et al. 2014), Hrp1 (LEEPER et al. 2010) e TAP (TEPLOVA et al. 2011). A presença de um “linker” flexível permite que proteínas multi-domínios explorem mais o espaço conformacional do que estruturas rígidas de mesmo tamanho. Ainda, a existência do “linker” restringe espacialmente a difusão de um domínio em relação ao outro, levando ao aumento da concentração local de um domínio após a interação do outro com o ligante de RNA (MACKERETH & SATTLER, 2012).

A fim de caracterizar movimentos internos lentos, que acontecem na escala de micro-a milissegundos, e se correlacionam com a taxa de interconversão entre mais de um estado conformacional em solução, experimentos de dispersão de relaxação por CPMG (DR CPMG) foram coletados para os domínios amino-terminais RRM1-2₁₋₁₈₉. DR CPMG permite a obtenção de informações cinéticas, termodinâmicas e estruturais acerca do evento de troca conformacional, desde que este aconteça dentro da janela de 0,3 – 10 ms. Este tipo de experimento se baseia na aplicação de uma série de pulsos “*spin-eco*” à magnetização transversa durante um tempo de relaxação específico, com o objetivo de refocar o alargamento das ressonâncias causado pela troca conformacional. Assim, as taxas de relaxação transversa efetiva (R_2^{eff}) são medidas em função da frequência de aplicação dos pulsos de CPMG (ν_{CPMG}), de modo que o refoco do alargamento das linhas de ressonância

geralmente acontece quando ν_{CPMG} excede metade da constante cinética do evento de troca (k_{ex}) (KLECKNER et al. 2011).

A **Figura 20** mostra as medidas de R_2^{eff} em função dos resíduos de RRM1-2₁₋₁₈₉ obtidas em duas frequências de CPMG (50 e 1000 Hz) em dois campos magnéticos distintos (11,7 e 16,5 T). Caso houvesse troca conformacional na escala de micro- a milissegundos, seria esperado um aumento de R_2^{eff} em baixas frequências de CPMG. A proximidade dos valores de R_2^{eff} nos dois valores de ν_{CPMG} , em ambos os campos medidos, sugere que RRM1-2₁₋₁₈₉ não exhibe movimentos internos nesta escala de tempo. Entretanto, ao analisarmos os dados de DR CPMG individualmente, observou-se que determinados aminoácidos apresentaram curvas de dispersão que exibem um ligeiro aumento de R_2^{eff} em frequências intermediárias de CPMG (**Figura 21**). Este comportamento sugere que os domínios amino-terminais RRM1-2₁₋₁₈₉ experimentam troca conformacional em um regime de tempo mais lento do que milissegundos. Estes resultados, juntamente com o fato de que o espectro $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ HSQC apresenta um grupo de ressonâncias excedentes, sugerem que RRM1-2₁₋₁₈₉ existe em um conjunto de conformações em solução, cuja taxa de troca entre elas seria da ordem de segundos.

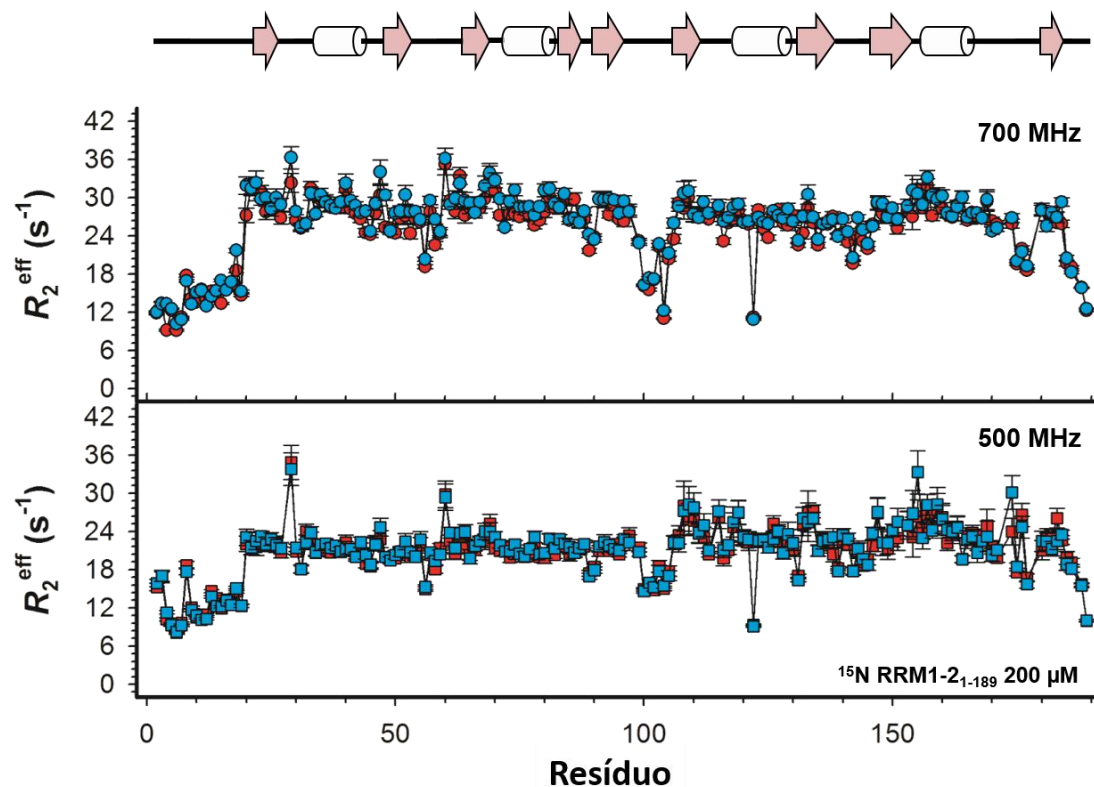


Figura 20: Dinâmica intermediária (μs - ms) de RRM1-2₁₋₁₈₉. Os valores de R_2^{eff} obtidos em duas frequências de CPMG (50 Hz, vermelho; 1000 Hz, azul) estão mostrados em função do número de resíduos da proteína. Abaixo, estão mostradas as medidas obtidas em 11,7 T, enquanto acima, as obtidas em 16,5 T. As barras representam os erros associados a cada medida. Os elementos de estrutura secundária estão mostrados no topo da figura, de acordo com a estrutura cristalográfica de RRM1-2₁₋₁₈₉ (PDB 4EGL). As setas representam as fitas- β , enquanto os cilindros, as α -hélices. A ausência de diferenças nas medidas de R_2^{eff} obtidas em duas frequências de CPMG (50 e 1000 Hz) sugere que RRM1-2₁₋₁₈₉ não experimenta troca conformacional no regime intermediário (μs - ms). O espectros foram adquiridos com uma amostra purificada de ^{15}N -RRM1-2₁₋₁₈₉ (0,9 mM) em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,0), NaCl 100 mM, DTT 5 mM e 90% H_2O /10% D_2O a temperatura de 25 °C.

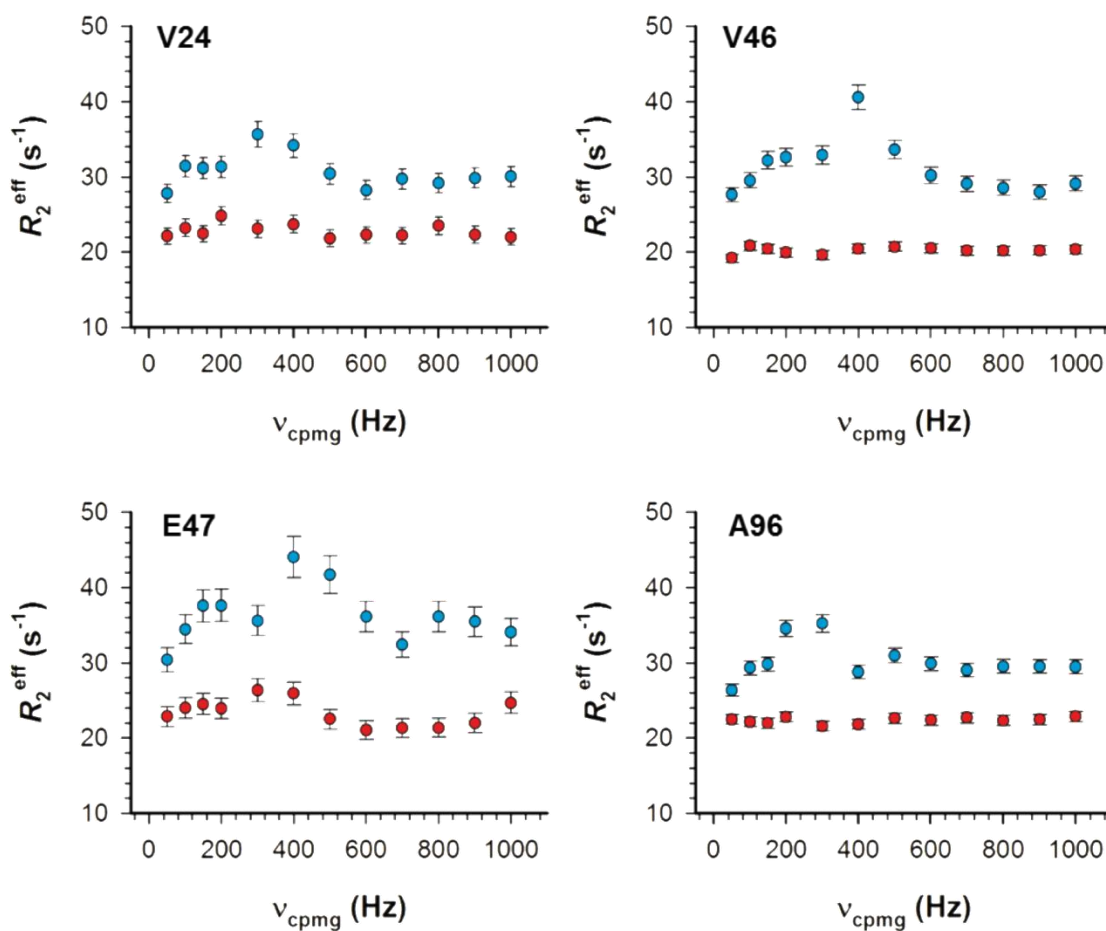


Figura 21: Curvas de DR CPMG para determinados resíduos de RRM1-2₁₋₁₈₉. Os perfis de DR CPMG, valores de R_2^{eff} em função da variação de ν_{CPMG} estão mostrados para os resíduos Val24, Val46, Glu47 e Ala96 de RRM1-2₁₋₁₈₉. Em vermelho, os dados obtidos em 11,7 T. Em azul, aqueles obtidos em 16,5 T. As curvas mostram um ligeiro aumento de R_2^{eff} em valores de ν_{CPMG} intermediários, indicativo de dinâmica lenta, na escala de segundos.

4.2.6. Caracterização do equilíbrio conformacional de RRM1-2₁₋₁₈₉

Técnicas de espectrometria de massa em condições nativas podem revelar informações estruturais importantes acerca do conjunto de conformações de uma dada proteína. Uma destas técnicas é a mobilidade iônica acoplada à espectrometria de massa, onde íons são separados de acordo com o tempo que levam para atravessar uma câmara preenchida com gás inerte sob a influência de um campo elétrico fraco. Os íons de maior volume irão sofrer um número maior de colisões com o gás inerte do que aqueles de mesma massa, mas que possuem uma conformação mais compacta. Os tempos de migração, também chamados de tempos de deriva, portanto, fornecem informações sobre a área de seção transversal do íon, ou seja, seu tamanho e formato. Assim, os dados de IM-MS geram espectros bidimensionais nos quais os íons são separados em uma dimensão de acordo com seus tempos de deriva e, em outra dimensão, segundo a razão massa/carga. Devido ao aumento da dimensionalidade, esta técnica fornece informações estruturais acerca de estados conformacionais co-populados e permite o estudo da dinâmica conformacional de proteínas (LANUCARA et al. 2014; KONIJNENBERG et al. 2013).

A fim de caracterizar o equilíbrio conformacional de RRM1-2₁₋₁₈₉ no estado livre, ou seja, na ausência de mRNA, a amostra de proteína foi analisada por ESI-IM-MS. A **Figura 22A** mostra toda a extensão do espectro 2D (tempo de deriva *versus* m/z) coletado para RRM1-2₁₋₁₈₉. Já no espectro de massa (intensidade *versus* m/z) é possível notar a presença de mais de uma distribuição de estados de carga, o que sugere uma mistura de confômeros para RRM1-2₁₋₁₈₉ no estado livre. Utilizando a seção de quadrupolo do espectrômetro de massa, selecionou-se o íon de estado de carga +10, referente ao monômero de RRM1-2₁₋₁₈₉. A análise do tempo de deriva do íon [M+10] revelou a presença de três populações conformacionais, cujos tempos de deriva são 75,1, 94,8 e 120,0 ms (**Figura 22B**). Os sinais em 75,1 e 94,8 ms são finos, bem resolvidos e mais intensos do que o sinal em 120 ms, que mostra menor intensidade, o que sugere que as conformações em 75,1 e 94,8 ms são relativamente populadas. O sinal com menor valor de tempo de deriva, ou seja, maior

mobilidade, pode ser associado a uma conformação mais compacta, enquanto os sinais em tempos de deriva maiores estão associados a conformações mais estendidas. Em resumo, os resultados de ESI-IM-MS indicam que RRM1-2₁₋₁₈₉ popula três conformações com graus de compactação diferentes na ausência de RNA.

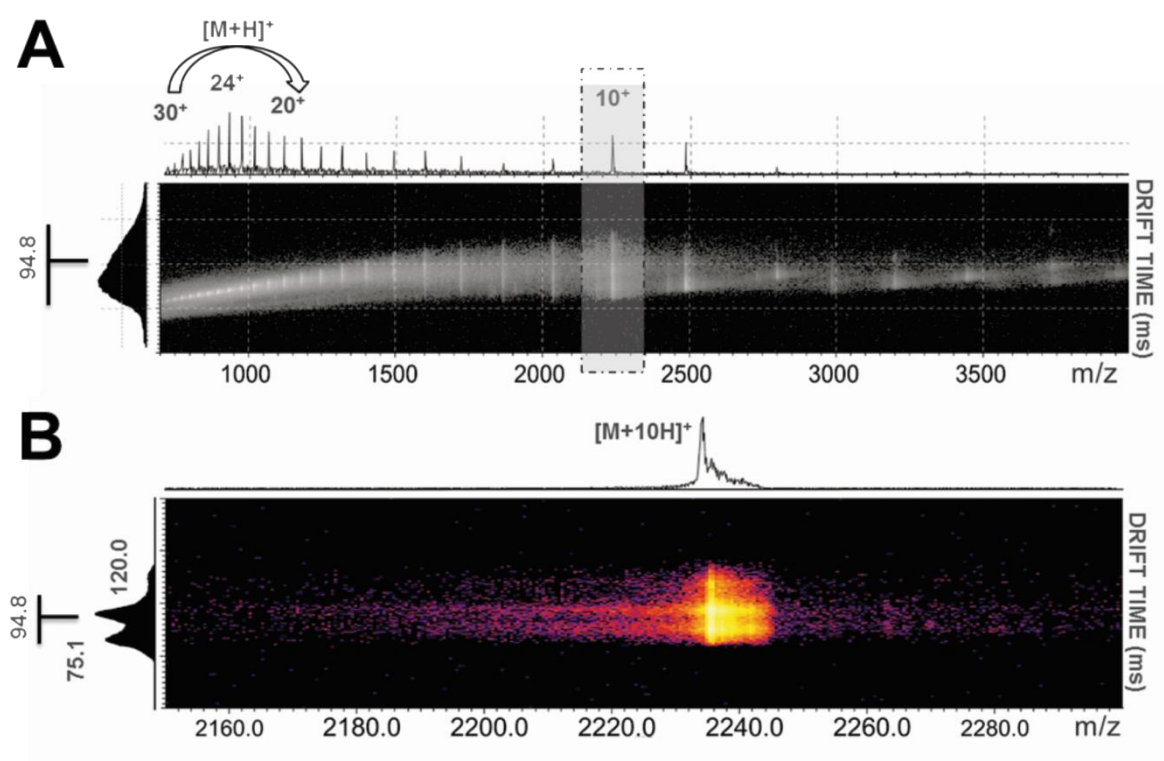


Figura 22: Análise de RRM1-2₁₋₁₈₉ por ESI-IM-MS. (A) Espectro de IM-MS 2D (tempo de deriva *versus* m/z) adquirido para uma amostra purificada de RRM1-2₁₋₁₈₉ a concentração de 700 μ M em tampão acetato de amônio (pH 7,2). Acima, o espectro de massa (intensidade *versus* m/z) evidenciando os íons com os diversos estados de carga. **(B)** Espectro de IM-MS 2D (tempo de deriva *versus* m/z) adquirido para o íon precursor $[M+10]$ selecionado no quadrupolo do espectrômetro. Os dados de IM-MS sugerem a presença de três populações conformacionais para a forma apo de RRM1-2₁₋₁₈₉, cujos tempos de deriva são 75,1, 94,8 e 120 ms.

Estudos prévios, utilizando espalhamento de raios-X a baixo ângulo, mostram que a curva de SAXS obtida para os domínios amino-terminais RRM1-2 de HuR no estado livre é melhor explicada através de um equilíbrio entre duas populações estruturais, uma mais compacta e outra mais estendida (KIM et al. 2011). Na presença de RNA, entretanto, os dados de SAXS podem ser explicados por uma única conformação compacta, cujas

dimensões moleculares são compatíveis com a estrutura cristalográfica do complexo RRM1-2:RNA (KIM et al. 2011). Nossos dados, obtidos para apo-RRM1-2₁₋₁₈₉, corroboram os resultados da literatura, além de mostrarem, pela primeira vez, a existência de uma terceira conformação minoritária. Embora informações estruturais acerca destes estados minoritários populados por apo-RRM1-2₁₋₁₈₉ ainda não estejam disponíveis, a presença de uma conformação mais compacta, similar à estrutura fechada obtida para o complexo RRM1-2:RNA, imediatamente sugere a participação do mecanismo de seleção conformacional no reconhecimento de RNA pela HuR. De acordo com este mecanismo, a proteína existe em um equilíbrio dinâmico entre um número de conformações permitidas, sendo uma delas estruturalmente similar àquela obtida na presença de ligante. O ligante então selecionaria esta conformação “ligada” pré-existente, deslocando o equilíbrio populacional no sentido da mesma (MACKERETH & SATTLER, 2012).

A participação do mecanismo de seleção conformacional na interação com RNA foi recentemente reportada para os domínios RRM1-RRM2 do fator de *splicing* U2AF⁶⁵ (MACKERETH et al. 2011; JENKINS et al. 2012; JENKINS et al. 2013). Neste caso, uma conformação fechada majoritária existe em equilíbrio com uma conformação aberta minoritária de U2AF⁶⁵ na ausência de RNA. Esta segunda conformação minoritária possui características estruturais semelhantes, ou seja, a mesma orientação de domínios daquela ligada a RNA. Interessantemente, mutações que alteram o equilíbrio conformacional sem afetarem diretamente a interação com RNA modulam a atividade de *splicing* da proteína.

A participação do mecanismo de seleção conformacional na dinâmica de interação de HuR com substratos de RNA não exclui o modelo de ajuste induzido originalmente proposto por Wang et al. (2013). Segundo este modelo, a presença de um “linker” flexível aumenta a concentração local dos domínios e promove a interação através de um mecanismo de “fly-casting”, onde o domínio de maior afinidade interage primeiro, facilitando a interação do segundo domínio. Neste contexto, alguns exemplos de “fly-casting” estão disponíveis na literatura, como a interação dos domínios RBDs da proteína ADAR2 com RNA dupla-fita (STEFL et al. 2010), bem como a interação da proteína tumorigênica Lin28 com os

precursores de miRNA da família let-7 (LOUGHLIN et al. 2011). Frequentemente, a interação proteína-ligante pode envolver uma combinação de ambos os mecanismos, seleção conformacional e ajuste induzido. Portanto, a fim de estimar a contribuição de cada um dos mecanismos para o reconhecimento proteína-RNA, informações acerca da cinética do processo de interação são necessárias (BOEHR et al. 2009; HAMMES et al. 2009).

Em resumo, os resultados sugerem a participação do modelo de seleção conformacional na interação de HuR com RNA e destacam o papel geral deste mecanismo no reconhecimento de oligonucleotídeos por proteína multi-domínios. Experimentos futuros realizados na presença de um substrato de RNA específico serão necessários para confirmar e aprofundar esta hipótese.

5. Conclusão

- Através da RMN multidimensional em alta resolução, foi possível assinalar 98% das ressonâncias de RRM1-2₁₋₁₈₉, com exceção dos resíduos Met1, Ile152, Ile179 e dos artefatos de clonagem N- e C-terminais.
- O espectro [¹H,¹⁵N] HSQC de RRM1-2₁₋₁₈₉ mostrou a presença de cinco ressonâncias extras, o que pode indicar a existência de ao menos uma segunda conformação minoritária em solução, cuja cinética de troca é da ordem de segundos.
- Os deslocamentos químicos do domínio RRM1 de HuR, tanto isolado quando no contexto do *tandem* RRM1-2, se mostraram muito semelhantes, sugerindo a ausência de contatos entres os domínios N-terminais.
- Os resultados de dinâmica mostraram que a região N-terminal intrinsecamente desordenada e o “linker” entre os domínios RRM1-2 são altamente flexíveis em solução. Além disso, resíduos presentes nos *loops* L3 (RRM1), L3' e L5' (RRM2) também experimentam dinâmica térmica (ps-ns).
- O baixo valor de τ_c estimado para RRM1-2₁₋₁₈₉ quando comparado a uma proteína globular de mesma massa molecular sugere que os domínios N-terminais RRM1 e RRM2 se comportam como módulos estruturais independentes em solução.
- Os dados de DR CPMG indicam que RRM1-2₁₋₁₈₉ não experimenta troca conformacional em regime intermediário (μ s-ms). Entretanto, o aumento de R_2^{eff} em frequências intermediárias de CPMG para determinados resíduos sugere um regime de troca mais lento, da ordem de segundos.
- Os dados de ESI-IM-MS obtidos para RRM1-2₁₋₁₈₉ na forma livre sugerem a existência de três conformações co-populadas, cujos tempos de deriva são 75,1, 94,8 e 120,0 ms.

- Em resumo, os resultados aqui mostrados sugerem a participação do mecanismo de seleção conformacional na dinâmica de interação de HuR com seus substratos de RNA.

6. Referências Bibliográficas:

AMALDI, F.; PIERANDREI-AMALDI, P. TOP genes: a translationally controlled class of genes including those coding for ribosomal proteins. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v. 18, p. 1–17, 1997.

BALTZ, A. G.; MUNSCHAUER, M.; SCHWANHÄUSER, B.; VASILE, A.; MURAKAWA, Y.; SHUELER, M.; YOUNGS, N.; PENFOLD-BROWN, D.; DREW, K.; MILEK, M.; WYLER, E.; BONNEAU, R.; SELBACH, M.; DIETRICH, C.; LANDTHALER, M. The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. **Molecular Cell**, v. 46, n. 5, p. 674–690, 2012.

BANEYX, F. Recombinant expression of proteins in Escherichia coli. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 411–421, 1999.

BARREAU, C.; PAILLARD, L.; OSBORNE, H. B. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 22, p. 7138–7150, 2006.

BEVILACQUA, A.; CERIANI, M. C.; CAPACCIOLI, S.; NICOLIN, A. Post-Transcriptional Regulation of Gene Expression by Degradation of Messenger RNAs. **Journal of Cell Physiology**, v. 195, n. 3, p. 356–372, 2003.

BLANCO, F. F.; PREET, R.; AGUADO, A.; VISHWAKARMA, V.; STEVENS, L. E.; VYAS, A.; SUBHASH, P.; XU, L.; WEIR, S. J.; ANANT, S.; MEISNER-KOBE, N.; BRODY, J. R.; DIXON, D. A. Impact of HuR inhibition by the small molecule MS-444 on colorectal cancer cell tumorigenesis. **Oncotarget**, v. 7, n. 45, p. 74043–74058, 2016.

BLAXALL, B. C.; DWYER-NIELD, L. D.; BAUER, K.; BOHLMAYER, T. J.; MALKINSON, A. M.; PORT, J. D. Differential expression and localization of the mRNA binding proteins, AU-rich element mRNA binding protein (AUF1) and Hu antigen R (HuR), in neoplastic lung tissue. **Molecular Carcinogenesis**, v. 28, n. 2, p. 76–83, 2000.

BLOMMEL, P. G.; FOX, B. G. A combined approach to improving large-scale production of Tobacco Etch Virus protease. **Protein Expression and Purification**, v. 55, n. 1, p. 53–68, 2007.

BOEHR, D. D.; NUSSINOV, R.; WRIGHT, P. E. The role of dynamic conformational ensembles in bimolecular recognition. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 11, p. 789–796, 2009.

BRENNAN, C. M.; GALLOUZI, I. E.; STEITZ, J. A. Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. **Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 1, p. 1–13, 2000.

BUCHAN, J. R.; PARKER, R. Eukaryotic Stress Granules : The Ins and Out of Translation. **Molecular Cell**, v. 36, n. 6, p. 932–941, 2009.

CAPUT, D.; BEUTLER, B.; HARTOG, K.; THAYER, R.; BROWN-SHIMER, S.; CERAMI, A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 6, p. 1670–1674, 1986.

CARR, H.; PURCELL, E. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. **Physical Review**, v. 94, n. 3, p. 630–638, 1954.

CARRINGTON, J. C.; DOUGHERTY, W. G. A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 10, p. 3391–3395, 1988.

CASTELLO, A.; FISCHER, B.; EICHELBAUN, K.; HOROS, R.; BECKMANN, B. M.; STREIN, C.; DAVEY, N. E.; HUMPHREYS, D. T.; PREISS, T.; STEINMETZ, L. M.; KRIJQSVELD, J.; HENTZE, M. W. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1393–1406, 2012.

CHEN, C. Y.; SHYU, A. B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, n. 11, p. 465–470, 1995.

CHEN, C. Y.; CHEN, T. M.; SHYU, A. B. Interplay of two functionally and structurally distinct domains of the c-fos AU-rich element specifies its mRNA-destabilizing function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 1, p. 416–26, 1994.

CLÉRY, A.; BLATTER, M.; ALLAIN, F. H. T. RNA recognition motifs: boring? Not quite. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18 n. 3 p. 290–298, 2008.

DAHANUKAR, A.; WHARTON, R. P. The Nanos gradient in *Drosophila* embryos is generated by translational regulation. **Genes & Development**, v. 10, n. 20, p. 2610–20, 1996.

DARAGAN, V.; MAYO, K. H. Mtional model analysis of protein and peptide dynamics using ¹³C and ¹⁵N NMR relaxation. **Progress in NMR Spectroscopy**, v. 31, n. 1, p. 63–105, 1997.

DASSI, E.; QUATTRONE, A. Tuning the engine, an introduction to resources on post-transcriptional regulation of gene expression. **RNA Biology**, v. 9, n. 10, p. 1224–1232, 2012.

DELAGLIO, F.; GRZESIEK, S.; VUISTER, G. W.; ZHU, G.; PFEIFER, J.; BAX, A. NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 6, n. 3, p. 277–293, 1995.

DESCHENÈS-FURRY, J.; PERRONE-BIZZOZERO, N.; JASMIN, B. J. The RNA-binding protein HuD: a regulator of neuronal differentiation, maintenance and plasticity. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 822–833, 2006.

DE SILANES, I. L.; FAN, J.; YAN, X.; ZONDERMAN, A. B.; POTAPOVA, O.; PIZER, E. S.; GOROSPE, M. Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. **Oncogene**, v. 22, p. 7146–7154, 2003.

DE SILANES, I. L.; ZHAN, M.; LAL, A.; YANG, X.; GOROSPE, M. Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 9, p. 2987–2992, 2004.

DE SILANES, I. L.; LAL, A.; GOROSPE, M. HuR: post-transcriptional paths to malignancy. **RNA Biology**, v. 2, n. 1, 11–13, 2005.

DENKERT, C.; WEICHERT, W.; WINZER, K. J.; MULLER, B. M.; NOSKE, A.; NIESPOREK, S.; KRISTIANSEN, G.; GUSKI, H.; DIETEL, M.; HAUPTMANN, S. Expression of the ELAV-like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma. **Clinical Cancer Reserach.**, v. 10, p. 5580–5586, 2004a.

DENKERT, C.; WEICHERT, W.; PEST, S.; KOCH, I.; LICHT, D.; KÖBEL, M.; RELES, A.; SEHOULI, J.; DIETEL, M.; HAUPTMANN, S. Overexpression of the Embryonic-Lethal Abnormal Vision-like protein HuR in ovarian carcinoma is a prognostic factor and is associated with increased cyclooxygenase 2 expression. **Cancer Research**, v. 64, n. 1, p. 189–195, 2004b.

DÍAZ-QUINTANA, A.; GARCÍA-MAURIÑO, S. M.; DÍAZ-MORENO, I. Dimerization model of the C-terminal RNA Recognition Motif of HuR. **FEBS Letters**, v. 589, n. 10, p. 1059–1066, 2015.

DOLLER, A.; PFEILSCHIFTER, J.; EBERHARDT, W. Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 12, p. 2165–2173, 2008.

DOYLE, M.; JANTSCH, M. F. New and old roles of the double-stranded RNA-binding domain. **Journal of Structural Biology**, v. 140, n. 1–3, p. 147–53, 2002.

FAN, X. C.; STEITZ, J. A. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR (nuclear localizationRNA degradationnuclear export). **Biochemistry**, v. 95, n. December, p. 15293–15298, 1998a.

FAN, X. C.; STEITZ, J. A. Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. **EMBO Journal**, v. 17, n. 12, p. 3448–3460, 1998b.

FARROW, N. A.; MUHANDIRAM, R.; SINGER, A. U.; PASCAL, S. M.; KAY, C. M.; GISH, G.; SHOELSON, S. E.; PAWSON, T.; FORMAN-KAY, J. D., KAY, L. E. Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ¹⁵N NMR relaxation. **Biochemistry**, v. 33, n. 19, p. 5984–6003, 1994.

GILLIS, P.; MALTER, J. S. The adenosine-uridine binding factor recognizes the AU-rich elements of cytokine, lymphokine, and oncogene mRNAs. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 5, p. 3172–7, 1991.

GLISOVIC, T.; BACHORIK, J. L.; YONG, J.; DREYFUSS, G.; RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. **FEBS Letters**, v. 582, n. 14, p. 1977–1986, 2008.

GRZESIEK, S.; BAX, A. An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 99, p. 201–207, 1992.

HAMMES, G. G.; CHANG, Y. C.; OAS, T. G. Conformational selection or induced fit; a fluz description of reaction mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 33, p. 13737–13741, 2009.

HINMAN, M. N.; LOU, H. Diverse molecular functions of Hu proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 20, p. 3168–3181, 2008.

JENKINS, J. L.; AGRAWAL, A. A.; GUPTA, A.; GREEN, M. R.; KIELKOPF, C. L. U2AF65 adapts to diverse pre-mRNA splice sites through conformtional selection of specific and promiscuous RNA recognition motifs. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 6, p. 3859–3873, 2013.

JENKINS, J. L.; KHOLISWA, M. L.; KIELKOPF, C. L. A broad range of conformations contribute to the solution ensemble of thee ssential splicing factor U2AF65. **Biochemistry**, v. 51, n. 26, 5223–5225, 2012.

KAY, L. E.; TORCHIA, D. A.; BAX, A. Backbone dynamics of proteins as studied by ¹⁵N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. **Biochemistry**, v. 28, n. 23, p. 8972-8979, 1989.

KIM, H. S.; WILCE, M. C. J.; YOGA, Y. M. K.; PENDINI, N. R.; GUNZBURG, M. J.; COWIESON, N. P.; WILSON, G. M.; WILLIAMS, B. R. G.; GOROSPE, M.; WILCE, J. A. Different modes of interaction by TIAR and HuR with target RNA and DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 3, p. 1117–1130, 2011.

KIM-HA, J.; KERR, K.; MACDONALD, P. M. Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. **Cell**, v. 81, n. 3, p. 403–12, 1995.

KLECKNER, I. R.; FOSTER, M. P. An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 8, p. 942–968, 2011.

KLUG, A. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 43, n. 1, p. 1–21, 2010.

KONIJNENBERG, A.; BUTTERER, A.; SOBOTT, F. Native ion mobility-mass spectrometry and related methods in structural biology. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 6, p. 1239–1256, 2013.

LAEMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LANUCARA, F.; HOLMAN, S. W.; GRAY, C. J.; EYERS, C. E. The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. **Nature Chemistry**, v. 6, p. 281–294, 2014.

LEEPER, T. C.; QU, X.; LU, C.; MOORE, C.; VARANI, G. Novel protein-protein contacts facilitate mRNA 3'-processing signal recognition by Rna15 and Hrp1. **Journal of Molecular Biology**, v. 401, n. 3, 334–349, 2010.

LEVY, A. P.; LEVY, N. S.; GOLDBERG, M. A. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 5, p. 2746–53, 1996.

LOUGHLIN, F. E.; GEBERT, L. F.; TOWBIN, H.; BRUNSCHWEIGER, A.; HALL, J.; ALLAIN, F. H. Structural basis of pre-let-7 miRNA recognition by the zinc knuckles of pluripotency factor Lin28. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 19, n. 1, p. 84–89, 2011.

LORIA, J. P.; RANCE, M.; PALMER, A. G. 3rd. A relaxation-compensated Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence for characterizing chemical exchange by NMR spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 10, p. 2331–2332, 1999.

LUNDE, B. M.; MOORE, C.; VARANI, G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 6, p. 479–90, jun. 2007.

MA, W. J.; CHENG, S.; CAMPBELL, C.; WRIGHT, A.; FURNEAUX, H. Cloning and characterization of HuR , a ubiquitously expressed Elav-like protein, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 14, p. 8144–8151, 1996.

MA, W. J.; FURNEAUX, H. Localization of the human HuR gene to chromosome 19p13.2. **Human Genetics**, v. 99, n. 1, p. 32–33, 1997.

MACKERETH, C. D.; MADL, T.; BONNAL, S.; SIMON, B.; ZANIER, K.; GASCH, A.; RYBIN, V.; VALCÁRCEL, J.; SATTTLER, M. Multi-domain conformational selection underlies pre-mRNA splicing regulation by U2AF. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 408–411, 2011.

MACKERETH, C. D.; SATTTLER, M. Dynamics in multi-domain protein recognition of RNA. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 22, p. 287–296, 2012.

MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **Review of Scientific Instruments**, v. 29, n. 8, p. 688–691, 1958.

MEISNER, N. C.; HINTERSTEINER, M.; MUELLER, K.; BAUER, R.; SEIFERT, J. M.; NEAGELI, H. U.; OTTL, J.; OBERER, L.; GUENAT, C.; MOSS, S.; HARRER, N.; WOISETSCHLARGER, M.; BAUEHLER, C.; UHL, V.; AUER, M. Identification and mechanistic characterization of low-molecular-weight inhibitors for HuR. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 8, p. 508–515, 2007.

MEISNER, N. C.; HINTERSTEINER, M.; SEIFERT, J. M.; BAUER, R.; BENOIT, R. M.; WIDMER, A.; SCHINDLER, T.; UHL, V.; LANG, M.; GSTACH, H.; AUER, M. Terminal adenosyl transferase activity of posttranscriptional regulator HuR revealed by confocal on-bead screening. **Journal of Molecular Biology**, v. 386, n. 2, p. 435–450, 2009.

MENDEZ, R.; RICHTER, J. D. Translational control by CPEB: a means to the end. **Nature Reviews. Molecular Cell biology**, v. 2, n. 7, p. 521–529, 2001.

MIGNONI, F.; GISSI, C.; LIUNI, S.; PESOLE, G. Untranslated regions of mRNAs. **Genome Biology**, v. 3, reviews0004.1, 2002.

MOORE, M. J. From Birth to Death: The Complex Lives of Eukaryotic mRNAs. **Science**, v. 309, n. 5740, p. 1514–1518, 2 set. 2005.

MUJO, A.; LIXA, C.; ANOBOM, C. D.; ALMEIDA, F. C.; PINHEIRO, A. S. ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonance assignments of the RRM1 domain of the key post-transcriptional regulator HuR. **Biomolecular NMR Assignments**, v. 9, n. 2, p. 281–284, 2014.

PETI, W.; PAGE, R. Strategies to maximize heterologous protein expression in Escherichia coli with minimal cost. **Protein Expression and Purification**, v. 51, n. 1, p. 1–10.

RAYMOND, V.; ATWATER, J. A.; VERMA, I. M. Removal of an mRNA destabilizing element correlates with the increased oncogenicity of proto-oncogene fos. **Oncogene Research**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 1989.

SATTLER, M.; SCHLEUCHER, J.; GRIESINGER, C. Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulse field gradients. **Progress in NMR Spectroscopy**, v. 34, n. 23, p. 93–158, 1999.

SHAW, G.; KAMEN, R. A conserved adenine-uridine sequence from the 3' untranslated region of granulocyte-monocyte colony stimulating factor messenger RNA mediates selective messenger RNA degradation. **Cell**, v. 46, n. 8, p. 659–668, 1986.

SCHELHORN, C.; GORDON, J. M.; RUIZ, L.; ALQUACIL, J.; PEDROSO, E.; MACIAS, M. J. RNA recognition and self-association of CPEB4 is mediated by its tandem RRM domains. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 15, p. 10185–10195, 2014.

SRIKANTAN, S.; GOROSOPPE, M. HuR function in disease. **Frontiers in Biosciences**, v. 17, 189–205, 2012.

STEFL, R.; OBERSTRASS, F. C.; HOOD, J. L.; JOURDAN, M.; ZIMMERMANN, M.; SKRISOVSKA, L.; MARIS, C.; PENG, L.; HOFR, C.; EMESON, R. B.; ALLAIN, F. H. The solution structure of the ADAR2 dsRBM-RNA complex reveals a sequence-specific readout of the minor groove. **Cell**, v. 143, n. 2, p. 225–237, 2010.

STONE, M. J.; FAIRBROTHER, W. J.; PALMER, A. G. 3rd; REIZER, J.; SAIER, M. H.; WRIGHT, P. E. Backbone dynamics of the Bacillus subtilis glucose permease IIA domain determined from ¹⁵N NMR relaxation measurements. **Biochemistry**, v. 31, n. 18, p. 4394–4406, 1992.

TEPLOVA, M.; WOHLBOLD, L.; KHIN, N. W.; IZAURRALDE, E.; PATEL, D. J. Structure-function studies of nucleocytoplasmic transport of retroviral genomic RNA by mRNA export factor TAP. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 18, n. 9, p. 990–998, 2011.

VRANKEN, W. F.; BOUCHER, W.; STEVENS, T. J.; FOGH, R. H.; PAJON, A.; LLINAS, M.; ULRICH, E. L.; MARKLEY, J. L.; IONIDES, J.; LAUE, E. D. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. **Proteins**, v. 59, n. 4, p. 687–696, 2005.

WANG, H. et al. The structure of the ARE-binding domains of Hu antigen R (HuR) undergoes conformational changes during RNA binding. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 69, n. 3, p. 373–380, 2013.

WANG, I.; HENNIG, J.; JAGATP, P. K. A.; SONNTAG, M.; VALCÁRCEL, J.; SATTLER, M. Structure, dynamics and RNA binding of the multi-domain splicing factor TIA-1. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 9, p. 5949–5966, 2014.

XIAO, L.; WANG, J. Y. Posttranscriptional regulation of gene expression in epithelial cells by polyamine. **Methods in Molecular Biology**, v. 720, p. 67–69, 2011.